



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

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

(11)



1-0039330

(51)^{2020.01} **A61K 39/385**; A61K 39/09; A61P 31/04; (13) **B**
A61K 9/00; A61K 39/00; A61K 39/145

(21) 1-2020-03444

(22) 04/12/2018

(86) PCT/US2018/063709 04/12/2018

(87) WO 2019/139692 18/07/2019

(30) 62/595,388 06/12/2017 US

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/09/2020 390

(73) Merck Sharp & Dohme LLC (US)

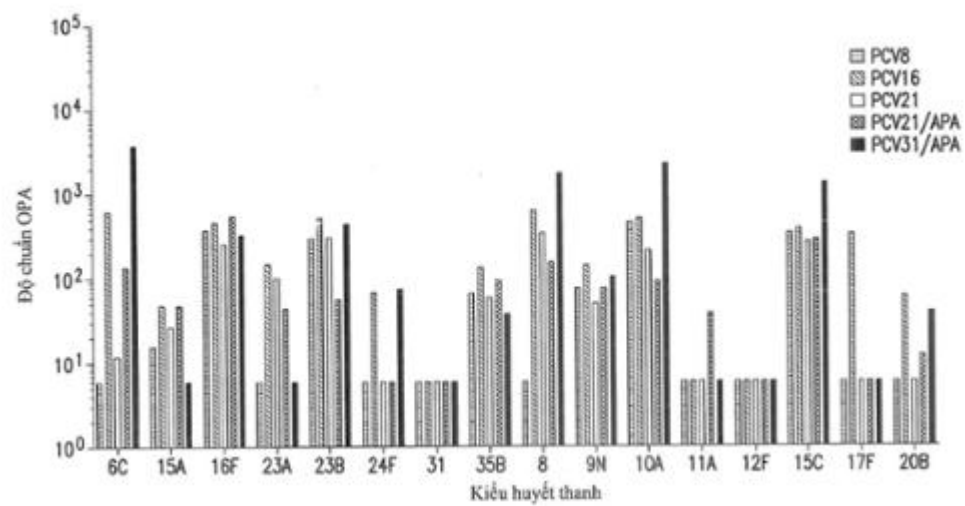
126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065, United States of America

(72) SMITH, William, J. (US); MCHUGH, Patrick (US); WINTERS, Michael Albert (US); SKINNER, Julie, M. (US); HE, Jian (US); MUSEY, Luwy (US); ABEYGUNAWARDANA, Chitrananda (US); CUI, Yadong Adam (US); KOSINSKI, Michael, J. (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH ĐA HÓA TRỊ CHỨA THỂ LIÊN HỢP
POLYSACARIT PROTEIN MANG STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều hơn một thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* là như được xác định ở đây. Theo một số phương án, ít nhất một trong các thể liên hợp polysacarit protein được tạo ra nhờ phản ứng liên hợp bao gồm dung môi aprotic. Theo các phương án khác, mỗi một trong các thể liên hợp polysacarit protein được tạo ra nhờ phản ứng liên hợp bao gồm dung môi aprotic. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở người bệnh bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị hữu ích trong việc mang lại sự bảo vệ chống lại lây nhiễm *S. pneumoniae* và các bệnh do *S. pneumoniae* gây ra. Chế phẩm theo sáng chế cũng hữu ích làm một phần của chế độ điều trị mang lại sự bảo vệ bổ sung cho các bệnh nhân đã được tiêm chủng vaccin đa hóa trị mà được chỉ định để ngăn ngừa bệnh do phế cầu khuẩn.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị có các thể liên hợp polysaccharit-protein riêng biệt. Mỗi thể liên hợp này gồm có polysaccharit nang được tạo ra từ một kiểu huyết thanh khác nhau của *Streptococcus pneumoniae* được liên hợp với protein mang, tốt hơn là CRM197. Chế phẩm sinh miễn dịch này đem lại phạm vi tác dụng rộng chống lại bệnh do phế cầu khuẩn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Streptococcus pneumoniae là vi khuẩn gram dương và là nguyên nhân phổ biến nhất gây ra bệnh vi khuẩn xâm lấn (như viêm phổi, nhiễm khuẩn huyết, viêm màng não và viêm tai giữa) ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Phế cầu khuẩn được bao bằng polysaccharit liên kết hóa học đem lại tính đặc hiệu với kiểu huyết thanh. Có trên 90 kiểu huyết thanh phế cầu khuẩn đã biết, và nang là thể quyết định độc lực cơ bản cho phế cầu khuẩn này, do nang này không những bảo vệ bề mặt trong của vi khuẩn chống bỏ thể, mà bản thân nó còn mang tính miễn dịch kém. Polysaccharit là kháng nguyên không phụ thuộc vào tế bào T, và, trong hầu hết các trường hợp, không thể được xử lý hoặc được có mặt trên các phân tử MHC để tương tác với tế bào T. Tuy nhiên, chúng có thể kích thích hệ miễn dịch thông qua một cơ chế thay thế bao gồm sự liên kết chéo của các thụ thể bề mặt trên tế bào B.

Vaccin polysaccharit phế cầu khuẩn đa hóa trị đã được cấp phép trong nhiều năm đã chứng minh được giá trị trong việc ngăn ngừa bệnh do phế cầu khuẩn ở người trưởng thành, đặc biệt là, người lớn tuổi và người có nguy cơ cao. Tuy nhiên, trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ lại đáp ứng kém với các polysaccharit phế cầu khuẩn không liên hợp. Vaccin liên hợp phế cầu khuẩn, Prevnar®, chứa 7 kiểu huyết thanh đã phân lập phổ biến nhất (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F và 23F) gây bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn ở trẻ nhỏ và trẻ sơ sinh tại thời điểm đó, được cấp phép lần đầu tiên ở Mỹ vào tháng hai năm 2000. Sau khi việc sử dụng Prevnar® phổ biến tại Mỹ, thì bệnh phế cầu

khuẩn xâm lấn giảm đáng kể ở trẻ em do các kiểu huyết thanh có trong Prevnar®. Xem tài liệu Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005, 54(36):893-7. Tuy nhiên, cũng có các hạn chế ở phạm vi tác dụng của kiểu huyết thanh với Prevnar® ở một số vùng trên thế giới và một số bằng chứng về một số kiểu huyết thanh nổi trội ở Mỹ (ví dụ, 19A và các kiểu huyết thanh khác). Xem tài liệu O'Brien *et al.*, 2004, *Am J Epidemiol* 159:634-44; Whitney *et al.*, 2003, *N Engl J Med* 348:1737-46; Kyaw *et al.*, 2006, *N Engl J Med* 354:1455-63; Hicks *et al.*, 2007, *J Infect Dis* 196:1346-54; Traore *et al.*, 2009, *Clin Infect Dis* 48:S181-S189.

Công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2006/0228380 mô tả vaccin liên hợp polysaccharit-protein phẩy cầu khuẩn hóa trị 13 chứa các kiểu huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F. Công bố đơn sáng chế Trung Quốc số CN 101590224 A mô tả vaccin liên hợp polysaccharit-protein phẩy cầu khuẩn hóa trị 14 chứa các kiểu huyết thanh 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F.

Các PCV khác chứa 7, 10, 11, hoặc 13 kiểu huyết thanh có trong PCV-15 (Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2011/0195086), nhưng can thiệp miễn dịch lại được quan sát thấy chỉ ở một số kiểu huyết thanh (ví dụ, bảo vệ giảm đi đối với kiểu huyết thanh 3 trong PCV-11 của GSK) và tốc độ đáp ứng giảm đi đối với kiểu huyết thanh 6B trong PCV-13 của Pfizer (PREVNAR® 13). Xem tài liệu Prymula *et al.*, 2006, *Lancet* 367:740-48 và Kieninger *et al.*, Safety and Immunologic Non-inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a 4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlers, được trình bày tại cuộc họp thường niên lần thứ 48 ICAAC/ISDA lần thứ 46, Washington DC, từ ngày 25 đến 28 tháng mười, 2008.

Các vaccin phẩy cầu khuẩn đa hóa trị hiện có có hiệu quả trong việc làm giảm tỷ lệ mắc bệnh do phẩy cầu khuẩn liên quan đến các kiểu huyết thanh có trong các vaccin này. Tuy nhiên, đã gia tăng tỷ lệ hiện hành bệnh của các kiểu huyết thanh biểu thị phẩy cầu khuẩn không có trong các vaccin hiện có bán. Theo đó, có nhu cầu về các chế phẩm vaccin phẩy cầu khuẩn khác nữa mà đem lại sự bảo vệ chống lại các

tập hợp kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn khác nhau và có thể mang lại sự bảo vệ bổ sung chống lại các kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn không có trong các vacxin hiện có bán.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysaccharit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysaccharit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* là như được xác định ở đây.

Theo các phương án cụ thể của sáng chế, các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm:

- a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B;
- b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20; và
- c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20.

Theo các phương án cụ thể khác của sáng chế, các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm:

- a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B;
- b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A; và
- c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A.

Theo các phương án cụ thể khác của sáng chế, các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm:

- a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B;
- b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B; và

c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B.

Theo một số phương án, tập hợp các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* được liệt kê trong các mục a), b) hoặc c) còn bao gồm: kiểu huyết thanh 6C, kiểu huyết thanh 6A, hoặc kiểu huyết thanh 6A và 6B.

Theo một số phương án, ít nhất một trong các thể liên hợp polysacarit protein được tạo ra nhờ phản ứng liên hợp chứa dung môi aprotic, ví dụ, dimethylsulfoxit (DMSO). Theo một số phương án cụ thể, mỗi một trong các thể liên hợp polysacarit protein được tạo ra nhờ phản ứng liên hợp chứa dung môi aprotic. Như được thể hiện trong bản mô tả, việc sử dụng DMSO làm dung môi trong phản ứng amin hóa khử của các thể liên hợp polysacarit-protein mang lại tính ổn định tốt hơn ngoài mong đợi và tính sinh miễn dịch tăng cường đối với các kiểu huyết thanh so với các thể liên hợp giống như vậy được tạo ra trong các điều kiện chứa nước.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở người bệnh bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Theo một số phương án của phương pháp theo sáng chế, bệnh nhân được điều trị từ trước bằng vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị.

Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế có thể được sử dụng làm một phần của chế độ điều trị với vaccin phế cầu khuẩn bổ sung khác. Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở người bệnh bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế, còn bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị theo trình tự bất kỳ. Theo các phương án cụ thể, vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị gồm có nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang. Theo các phương án khác, vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị gồm có các polysacarit nang không liên hợp.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra thể liên hợp polysacarit-protein *Streptococcus pneumoniae* kiểu huyết thanh 8 bằng cách sử dụng phản ứng liên hợp

trong dung môi aprotic, trong đó phản ứng liên hợp này không sử dụng xyanoborohydrua.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysaccharit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysaccharit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh chọn lọc của *S. pneumoniae* đem lại tính phản ứng chéo với các kiểu huyết thanh chọn lọc khác.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện phổ ^1H NMR một chiều 600 MHz của polysaccharit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 6C trong đơteri oxit (D_2O) ở nhiệt độ 50°C . Các tín hiệu bắt nguồn từ các chất nội chuẩn (DMSO và $\text{DSS-}d_6$) và nước dư (HOD) được đánh dấu. Các tín hiệu nhỏ được đánh dấu bởi * là do các lượng dư vách tế bào *S. pneumoniae* như C-polysaccharit và/hoặc peptidoglycan.

Fig.2 thể hiện phổ ^1H NMR một chiều 600 MHz của polysaccharit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 15A trong đơteri oxit (D_2O) ở nhiệt độ 50°C . Các tín hiệu bắt nguồn từ các chất nội chuẩn (DMSO và $\text{DSS-}d_6$) và nước dư (HOD) được đánh dấu. Các tín hiệu nhỏ được đánh dấu bởi * là do các lượng dư vách tế bào *S. pneumoniae* như C-polysaccharit và/hoặc peptidoglycan.

Fig.3 thể hiện phổ ^1H NMR một chiều 600 MHz của polysaccharit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 15B được khử O-axetyl trong đơteri oxit (D_2O) ở nhiệt độ 50°C . Các tín hiệu bắt nguồn từ các chất nội chuẩn (DMSO và $\text{DSS-}d_6$) và nước dư (HOD) được đánh dấu. Các tín hiệu nhỏ được đánh dấu bởi * là do các lượng dư vách tế bào *S. pneumoniae* như C-polysaccharit và/hoặc peptidoglycan.

Fig.4 thể hiện phổ ^1H NMR một chiều 600 MHz của polysaccharit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 35B trong D_2O ở nhiệt độ 50°C . Các tín hiệu bắt nguồn từ các chất nội chuẩn (DMSO và $\text{DSS-}d_6$) và nước dư (HOD) được đánh dấu. Các tín hiệu nhỏ được đánh dấu bởi * là do các lượng dư vách tế bào *S. pneumoniae* như C-polysaccharit và/hoặc peptidoglycan.

Fig.5 thể hiện vùng đồng nhất ^1H NMR hữu dụng cho việc đồng nhất hóa kiểu huyết thanh của kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 6C. Các vị trí báo hiệu của mỗi proton anome của đơn vị lặp từ mỗi gốc monosacarit được đánh dấu.

Fig.6 thể hiện vùng đồng nhất ^1H NMR hữu dụng cho việc đồng nhất hóa kiểu huyết thanh của kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 15A. Các vị trí báo hiệu của mỗi proton anome của đơn vị lặp từ mỗi gốc monosacarit được đánh dấu.

Fig.7 thể hiện vùng đồng nhất ^1H NMR hữu dụng cho việc đồng nhất hóa kiểu huyết thanh của kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 15B được khử O-axetyl. Các vị trí báo hiệu của mỗi proton anome từ mỗi gốc monosacarit được đánh dấu.

Fig.8 thể hiện vùng đồng nhất ^1H NMR hữu dụng cho việc đồng nhất hóa kiểu huyết thanh của kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 35B. Các vị trí báo hiệu của mỗi proton anome của đơn vị lặp từ mỗi gốc monosacarit được đánh dấu.

Fig.9A đến Fig.9C thể hiện phổ ^1H NMR một chiều 600 MHz của polysacarit nang tự nhiên từ kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 15B (Fig.9A), polysacarit nang được khử O-axetyl từ kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 15B (Fig.9B) và polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 15C (Fig.9C). Thu được phổ trong đơteri oxit (D_2O) ở nhiệt độ 50°C . Các tín hiệu bắt nguồn từ các chất nội chuẩn (DMSO và DSS-d6) và nước dư (HOD) được đánh dấu. Các tín hiệu được đánh dấu bởi * là do lượng dư vách tế bào *S. pneumonia* như C-polysacarit và/hoặc peptidoglycan.

Fig.10A đến Fig.10C thể hiện vùng anome của phổ ^1H NMR một chiều 600 MHz của polysacarit nang tự nhiên từ kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 15B (Fig.10A), polysacarit nang được khử O-axetyl từ kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 15B (Fig.10B) và polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 15C (Fig.10C). Fig.10D đến Fig.10F thể hiện các vùng của phổ trong đó tín hiệu O-axetyl và N-axetyl methy của polysacarit nang tự nhiên từ kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 15B (Fig.10D) polysacarit nang được khử O-axetyl từ kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 15B (Fig.10E) và polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 15C (Fig.10F).

Fig.11 thể hiện tác động của thời gian và nhiệt độ (lên đến 12 tuần ở nhiệt độ 4°C-hình thoi, lên đến 4 tuần ở nhiệt độ 25°C-hình vuông, lên đến 4 tuần ở nhiệt độ 37°C-hình tam giác) đến nồng độ polysacarit của sản phẩm thuốc PCV16 (0,128mg/mL) hoặc PCV21 (0,084mg/mL hoặc 0,169mg/mL) bằng cách sử dụng HPSEC-UV/MALS/RI (xem ví dụ 39).

Fig.12 thể hiện tác động của việc khuấy xoay vòng ngang và nhiệt độ (1 tuần ở nhiệt độ 4°C, 25°C, hoặc 37°C) đến nồng độ polysacarit của sản phẩm thuốc PCV16 (0,128mg/mL) hoặc PCV21 (0,084mg/mL hoặc 0,169mg/mL) được phân tán trong xi lanh làm đầy từ trước (xem ví dụ 39).

Fig.13 thể hiện tác động của nồng độ PS theo thời gian và nhiệt độ (lên đến 4 tuần ở nhiệt độ 4°C, 25°C, hoặc 37°C) đến phân tử lượng trung bình (M_w và M_n) của sản phẩm thuốc PCV16 (0,128mg/mL) hoặc PCV21 (0,084mg/mL hoặc 0,169mg/mL) bằng cách sử dụng HPSEC-UV/MALS/RI.

Fig.14A và Fig.14B thể hiện tác động của thời gian và nhiệt độ (lên đến 1 tuần ở nhiệt độ 4°C hoặc 37°C) đến tính cân bằng của vacxin liên hợp phế cầu khuẩn (PCV15 hoặc PCV16) được tạo ra với các được chất được liên hợp trong A) dung môi protic (PCV15 được phối trộn bằng cách sử dụng tất cả các dạng liên hợp chứa nước) hoặc B) dung môi aprotic (PCV16 được phối trộn bằng cách sử dụng tất cả các dạng liên hợp DMSO ở 0,064mg/mL PnPs) bằng cách sử dụng quang phổ huỳnh quang protein nội tại với bước sóng kích thích ở 280nm (ví dụ 40).

Fig.15 thể hiện độ chuẩn pha loãng kháng thể IgG bằng ELISA (sau liều 2) đối với thỏ được tạo miễn dịch bằng kiểu huyết thanh hóa trị một *S. pneumoniae* được liên hợp với CRM197 và được phối trộn với chất phụ trợ nhôm phosphat (aluminum phosphate adjuvant-APA). Các ký hiệu chỉ từng độ chuẩn riêng rẽ và các thanh báo lỗi biểu thị khoảng tin cậy (confidence interval-CI) 95% của độ chuẩn trung bình hình học (geometric mean titer-GMT).

Fig.16 thể hiện các độ chuẩn pha loãng OPA đặc hiệu kiểu huyết thanh (sau liều 2) đối với thỏ được tạo miễn dịch bằng kiểu huyết thanh hóa trị một *S. pneumoniae* được liên hợp với CRM197 và được phối trộn với chất phụ trợ nhôm

phosphat (APA). Các ký hiệu chỉ từng độ chuẩn riêng rẽ và các thanh báo lỗi biểu thị khoảng tin cậy (confidence interval-CI) 95% của độ chuẩn trung bình hình học (GMT).

Fig.17 thể hiện các độ chuẩn pha loãng kháng thể IgG bằng ELISA (sau liều 2) đối với thỏ được tạo miễn dịch bằng thể liên hợp hóa trị một kiểu huyết thanh 15 *S. pneumoniae*. Trục X chỉ vaccin được sử dụng để tạo miễn dịch cho thỏ. Các đường nét đứt phân tách ba thử nghiệm ELISA tách biệt bằng cách sử dụng polysacarit phế cầu khuẩn tách biệt làm kháng nguyên phủ. Các ký hiệu chỉ từng độ chuẩn riêng rẽ và các thanh báo lỗi biểu thị khoảng tin cậy (confidence interval-CI) 95% của độ chuẩn trung bình hình học (GMT).

Fig.18 thể hiện độ chuẩn pha loãng OPA đặc hiệu kiểu huyết thanh (tiền miễn dịch, sau liều 1 (PD1, được gom lại) và sau liều 2 (PD2)) đối với thỏ được tạo miễn dịch bằng thể liên hợp hóa trị một kiểu huyết thanh 15 *S. pneumoniae*. Trục X chỉ vaccin được sử dụng để tạo miễn dịch cho thỏ. Các đường nét đứt phân tách ba thử nghiệm OPA bằng cách sử dụng các chủng vi khuẩn *S. pneumoniae* tách biệt. Các ký hiệu chỉ từng độ chuẩn riêng rẽ và các thanh báo lỗi biểu thị khoảng tin cậy (confidence interval-CI) 95% của độ chuẩn trung bình hình học (GMT).

Fig.19A thể hiện sự so sánh giữa các đáp ứng kháng thể PD1 trong NZWR (5 trong mỗi nhóm) sau khi tiêm vaccin với lượng 4, 2, 1, 0,4, 0,08 hoặc 0,016µg/liều PCV21. Các ký hiệu chỉ tỷ lệ độ chuẩn trung bình hình học (GMT) của PD1 (nhóm 2µg/liều so với các nhóm liều khác) với các thanh báo lỗi biểu thị khoảng tin cậy (CI) 95%. Fig.19B thể hiện các tỷ lệ GMT PD1 so sánh liều PCV21 (CI 95%) tương ứng với Fig.19A tỷ lệ GMT có hạn độ tin cậy thấp hơn 95% vượt quá 1,0 được gạch chéo màu xám nhạt và tỷ lệ GMT có hạn độ tin cậy cao hơn 95% nhỏ hơn 1,0 được gạch chéo màu xám đậm. Dữ liệu kiểu huyết thanh 15B được bao gồm để đánh giá sự bảo vệ chéo.

Fig.20A thể hiện sự so sánh của các đáp ứng kháng thể PD2 trong NZWR (5 trong mỗi nhóm) sau khi tiêm vaccin với lượng 4, 2, 1, 0,4, 0,08 hoặc 0,016µg/liều PCV21. Các ký hiệu chỉ tỷ lệ GMT của PD2 (nhóm 2µg/liều so với các nhóm liều

khác) với các thanh báo lỗi biểu thị CI 95%. Fig.20B thể hiện các tỷ lệ GMT PD2 so sánh liều PCV21 (khoảng tin cậy 95%) tương ứng với Fig.20A tỷ lệ GMT có hạn độ tin cậy thấp hơn 95% vượt quá 1,0 được gạch chéo màu xám nhạt. Dữ liệu kiểu huyết thanh 15B được bao gồm để đánh giá sự bảo vệ chéo.

Fig.21A thể hiện các độ chuẩn pha loãng OPA của PD1 đặc hiệu kiểu huyết thanh đối với thỏ được tạo miễn dịch bằng PCV21 (2 μ g/PnPs). Các ký hiệu chỉ từng độ chuẩn riêng rẽ và các thanh báo lỗi biểu thị khoảng tin cậy 95% (CI) của các độ chuẩn trung bình hình học (GMT). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Fig.21B thể hiện các độ chuẩn pha loãng OPA của PD2 đặc hiệu kiểu huyết thanh đối với thỏ được tạo miễn dịch bằng PCV21 (2 μ g/PnPs). Các ký hiệu chỉ từng độ chuẩn riêng rẽ và các thanh báo lỗi biểu thị khoảng tin cậy 95% (CI) của các độ chuẩn trung bình hình học (GMT), **** $p < 0,0001$. Dữ liệu kiểu huyết thanh 15B được bao gồm để đánh giá sự bảo vệ chéo.

Fig.22A-Fig.22C thể hiện tác động của thời gian và nhiệt độ (tức là 7 ngày ở nhiệt độ 4°C, 1 ngày ở nhiệt độ 37°C hoặc 7 ngày ở nhiệt độ 37°C) đến tính cân bằng của ba vaccin liên hợp phế cầu khuẩn (PCV1, PCV7, và PCV14), được tạo ra với tất cả các dược chất được liên hợp trong dung môi chứa nước hoặc dung môi DMSO, bằng cách sử dụng quang phổ huỳnh quang protein nội tại với bước sóng kích thích ở 280nm. Fig.22D thể hiện tác động của thời gian và nhiệt độ (tức là 7 ngày ở nhiệt độ 4°C hoặc 37°C) đến tính cân bằng của vaccin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 21 (PCV21 ở 0,084mg/mL PnPs), được tạo ra với tất cả các dược chất được liên hợp trong dung môi DMSO, bằng cách sử dụng quang phổ huỳnh quang protein nội tại với bước sóng kích thích ở 280nm.

Fig.23 thể hiện tác động của nhiệt độ (7 ngày ở nhiệt độ 4°C hoặc 37°C) và khuấy ở nhiệt độ 4°C đến sự phân bố theo cỡ hạt như được phân tích bởi phân tích theo dấu vết hạt nano (Nanoparticle Tracking Analysis-NTA) của sáu (6) sản phẩm thuốc vaccin liên hợp phế cầu khuẩn PCV21 được phối trộn với PS-20 (0%, 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,15% hoặc 0,2%; tất cả các trọng lượng/thể tích của PS-20) ở 0,084mg/mL PnPs.

Fig.24 thể hiện tác động của nhiệt độ (4°C và 37°C) và việc khuấy đến ba phân tử lượng trung bình của sản phẩm thuốc PCV21 như được phân tích bởi thử nghiệm HPSEC/UV/MALS/RI. Ba sản phẩm thuốc vacxin liên hợp phế cầu khuẩn PCV21 được phối trộn với các nồng độ khác nhau của PS-20 (0,05%, 0,1%, và 0,15% trọng lượng/thể tích) ở 0,084mg/mL PnPs.

Fig.25 cho thấy rằng chuột nhắt được tạo miễn dịch bằng PCV21 được bảo vệ khỏi thách thức nội khí quản *S. pneumoniae* 24F.

Fig.26A-Fig.26B thể hiện các độ chuẩn pha loãng kháng thể IgG của pre (được gom lại), PD1 (được gom lại) và PD2 như được xác định bằng ECL đối với thử được tạo miễn dịch bằng PCV21 không được phụ trợ hoặc phối trộn với APA. Các thanh báo lỗi biểu thị khoảng tin cậy (CI) 95% của độ chuẩn trung bình hình học (GMT). Dữ liệu kiểu huyết thanh 15B được bao gồm để đánh giá sự bảo vệ chéo.

Fig.27A-Fig.27C thể hiện các độ chuẩn pha loãng kháng thể IgG của pre (được gom lại), PD1 (được gom lại) và PD2 như được xác định bằng ECL đối với thử được tạo miễn dịch bằng PCV8 không được phụ trợ, PCV16 không được phụ trợ, và PCV31 có APA. Các thanh báo lỗi biểu thị khoảng tin cậy (CI) 95% của độ chuẩn trung bình hình học (GMT). Dữ liệu kiểu huyết thanh 15B được bao gồm để đánh giá sự bảo vệ chéo.

Fig.28 thể hiện sự so sánh giữa các đáp ứng kháng thể ECL PD2 trong NZWR (5 trong mỗi nhóm) sau khi tiêm vacxin PCV21 có hoặc không có APA. Các ký hiệu chỉ tỷ lệ GMT PD2 với các thanh báo lỗi biểu thị CI 95%. Dữ liệu kiểu huyết thanh 15B được bao gồm để đánh giá sự bảo vệ chéo.

Fig.29 thể hiện sự so sánh giữa các đáp ứng kháng thể ECL PD2 trong NZWR (5 trong mỗi nhóm) đối với các kiểu huyết thanh phổ biến và kiểu huyết thanh được bảo vệ chéo 15B sau khi tiêm vacxin PCV21, PCV8 hoặc PCV16. Các ký hiệu chỉ tỷ lệ GMT ECL của PD2 với các thanh báo lỗi biểu thị CI 95%.

Fig.30 thể hiện sự so sánh giữa các đáp ứng kháng thể ECL PD2 trong NZWR (5 trong mỗi nhóm) đối với các kiểu huyết thanh phổ biến và kiểu huyết thanh được bảo vệ chéo 15B sau khi tiêm vaccin PCV21/APA hoặc PCV31/APA. Các ký hiệu chỉ tỷ lệ GMT ECL của PD2 với các thanh báo lỗi biểu thị CI 95%.

Fig.31A-Fig.31D thể hiện các độ chuẩn pha loãng OPA của pre (được gom lại) (A, B) và PD2 (C, D) đặc hiệu kiểu huyết thanh đối với thử được tạo miễn dịch bằng PCV. Các thanh báo lỗi biểu thị CI 95% của GMT. PCV21 được sử dụng làm điểm chuẩn cho các so sánh thống kê, * $p < 0,05$. Fig.A và Fig.C thể hiện dữ liệu đối với 8 kiểu huyết thanh phổ biến trong tất cả các PCV được đánh giá (6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B) và 8 kiểu huyết thanh phổ biến khác nữa trong PCV16, PCV21 và PCV31 (8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20B). Fig.B và Fig.D thể hiện dữ liệu đối với 16 kiểu huyết thanh khác nữa không được bao gồm trên Fig.A và Fig.C. Năm trong số chúng cũng là các kiểu huyết thanh phổ biến trong PCV21 và PCV31 (3, 7F, 19A, 22F, 33F), mười kiểu huyết thanh được chứa riêng trong PCV31 (1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F). Dữ liệu kiểu huyết thanh 15B được bao gồm để đánh giá sự bảo vệ chéo.

Fig.32 thể hiện độ chuẩn pha loãng kháng thể IgG của pre, PD1, PD2 và PD3 như được xác định bằng ECL đối với khi Rezut trưởng thành ($n=8$) được tạo miễn dịch bằng PCV21. Các thanh báo lỗi biểu thị CI 95% của GMT. Dữ liệu kiểu huyết thanh 15B được bao gồm để đánh giá sự bảo vệ chéo.

Fig.33 thể hiện độ chuẩn pha loãng OPA của pre, PD1 (được gom lại) và PD3 của khi Rezut trưởng thành được tạo miễn dịch bằng PCV21 ($n=8$). Các thanh báo lỗi biểu thị CI 95% của GMT. Dữ liệu kiểu huyết thanh 15B được bao gồm để đánh giá sự bảo vệ chéo.

Fig.34 thể hiện độ chuẩn OPA của pre và PD3 (ngày 70) đối với bốn kiểu huyết thanh không có trong vaccin PCV21 đối với khi Rezut trưởng thành được tạo miễn dịch bằng PCV21.

Fig.35 thể hiện sự so sánh giữa các đáp ứng kháng thể ECL của PD1 ở khi Rezut trưởng thành (5 trong mỗi nhóm) sau khi tiêm vaccin PCV21 có hoặc không

có APA. Các ký hiệu chỉ tỷ lệ GMT ECL của PD1 (PCV21 so với PCV21/APA) có các thanh báo lỗi biểu thị CI 95%. Dữ liệu kiểu huyết thanh 15B được bao gồm để đánh giá sự bảo vệ chéo.

Fig.36 thể hiện đáp ứng kháng thể IgG PD1 đối với kiểu huyết thanh 3, 7F, 19A, 22F, và 33F ở khi Rezut trưởng thành (2-5 con mỗi nhóm) sau khi tiêm vaccin PCV21 so với PCV15 hoặc Prevnar13. Các ký hiệu chỉ tỷ lệ GMT ECL của PD1 với các thanh báo lỗi biểu thị CI 95%.

Fig.37 thể hiện độ chuẩn pha loãng kháng thể IgG bằng ELISA đối với 6A, 6B, và 6C ((tiền miễn dịch và PD1, được gom lại) và PD2) đối với thỏ được tạo miễn dịch bằng sản phẩm thuốc hóa trị một 6A-CRM197 (A) hoặc 6B-CRM197 (B). Các thanh chỉ độ chuẩn trung bình hình học (GMT) và các thanh báo lỗi biểu thị khoảng tin cậy (CI) 95% của GMT.

Fig.38 thể hiện độ chuẩn pha loãng OPA đặc hiệu kiểu huyết thanh đối với 6A, 6B, và 6C ((tiền miễn dịch và PD1 được gom lại) và PD2) đối với thỏ được tạo miễn dịch bằng sản phẩm thuốc hóa trị một 6A-CRM197 (A) hoặc 6B-CRM197 (B). Các thanh chỉ độ chuẩn trung bình hình học (GMT) và các thanh báo lỗi biểu thị khoảng tin cậy (CI) 95% của GMT.

Fig.39 thể hiện độ chuẩn pha loãng OPA đặc hiệu kiểu huyết thanh đối với 20A và 20B (tiền miễn dịch (được gom lại), PD1 và PD2) đối với thỏ được tạo miễn dịch bằng 20A-CRM197/APA (A) hoặc PCV21 (B). Các thanh chỉ độ chuẩn trung bình hình học (GMT) và các thanh báo lỗi biểu thị khoảng tin cậy (CI) 95% của GMT.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit-protein phế cầu khuẩn, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* là như được xác định ở đây. Theo một số phương án, chế phẩm sinh miễn dịch chứa tập hợp của các kiểu huyết thanh

phế cầu khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm: (a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B; (b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20; và (c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20. Theo một số phương án, chế phẩm sinh miễn dịch chứa tập hợp của các kiểu huyết thanh phế cầu khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm: (a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B; (b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B; và (c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B. Theo các phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch chứa tập hợp của các kiểu huyết thanh phế cầu khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm: (a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B; (b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A; và (c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A. Theo các phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch chứa (i) kiểu huyết thanh 6A; (ii) kiểu huyết thanh 6A và 6B; hoặc (iii) kiểu huyết thanh 6C. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến nhiều thể liên hợp polysacarit protein phế cầu khuẩn *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm kiểu huyết thanh 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F và 35B. Chế phẩm này được phát hiện ra là sinh miễn dịch ở thỏ và tạo ra kháng thể chức năng tiêu diệt các chủng vi khuẩn kiểu vaccin ở tất cả các liều thử nghiệm (ví dụ 43). Theo một ví dụ cụ thể khác, sáng chế đề cập đến nhiều thể liên hợp polysacarit protein phế cầu khuẩn *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* chứa các kiểu huyết thanh 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20, 6A, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B. Theo một ví dụ cụ thể khác, sáng chế đề cập đến nhiều thể liên hợp polysacarit protein phế cầu khuẩn *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* chứa các kiểu huyết thanh 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F,

15C, 17F, 20B, 6A, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B. Theo một ví dụ cụ thể khác, sáng chế đề cập đến nhiều thể liên hợp polysacarit protein phẩy cầu khuẩn *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm các kiểu huyết thanh 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B.

Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế hữu ích cho việc tạo miễn dịch cho bệnh nhân kháng kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* kiểu vaccin và là một phần của chế độ điều trị với (các) vaccin phẩy cầu khuẩn bổ sung khác. Theo đó, sáng chế đề cập đến phương pháp cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở người bệnh bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế, và còn bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng vaccin phẩy cầu khuẩn đa hóa trị, theo trình tự bất kỳ. Theo các phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế được dùng cho bệnh nhân đã được tạo miễn dịch từ trước bằng một vaccin phẩy cầu khuẩn đa hóa trị khác.

Theo các phương án của sáng chế, các thể liên hợp từ ít nhất một kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic như DMSO. Theo các phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp phẩy cầu khuẩn mà mỗi thể liên hợp này được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic. Được thể hiện trong bản mô tả này rằng các sản phẩm thuốc PCV1, PCV7, PCV14, PCV16 và PCV21 (như được xác định, dưới đây) chứa các dược chất mà mỗi sản phẩm thuốc này được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic là ổn định chống lại sự khử polyme hóa hoặc sự thoái biến hóa học của hydrat cacbon và ổn định chống lại sự tích tụ của protein trong dạng phối trộn sản phẩm thuốc (xem ví dụ 40 và ví dụ 45). Việc sử dụng dung môi DMSO làm tăng cường sự liên kết cộng hóa trị của polysacarit đối với protein thông qua sự tiêu thụ trực tiếp các gốc lysin trên bề mặt của protein mang. Sự liên kết cộng hóa trị gia tăng mang lại lợi ích trực tiếp đến sự gia tăng tính cân bằng của thể liên hợp polysacarit protein

của chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các kháng nguyên polysacarit được liên hợp trong DMSO.

I. Định nghĩa và các chữ viết tắt

Như được sử dụng trong bản mô tả và các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các chữ viết tắt sau đây được áp dụng:

APA	chất phụ trợ nhôm phosphat
APC	tế bào trình diện kháng nguyên
CI	khoảng tin cậy
DMSO	dimethylsulfoxit
DS	độc chất polysacarit-protein
GMC	nồng độ trung bình hình học
GMT	độ chuẩn trung bình hình học
HPSEC	sắc ký hiệu năng cao loại trừ kích cỡ
IM	trong cơ
LOS	lipo-oligosacarit
LPS	lipopolysacarit
MALS	tán xạ ánh sáng nhiều lớp
MBC	thể liên hợp khối hóa trị một
MOPA	thử nghiệm thực bào bởi opsonin đa hợp
MW	phân tử lượng
NMWCO	cắt giảm phân tử lượng định mức
NZWR	thỏ trắng New Zealand
OPA	thử nghiệm thực bào bởi opsonin
PCV	vacxin liên hợp phế cầu khuẩn
PD1	sau liều 1
PD2	sau liều 2
PnPs	polysacarit phế cầu khuẩn
Ps	polysacarit
PS-20	polysorbat-20
RI	chỉ số khúc xạ

UV	tia cực tím
w/v	trọng lượng/thể tích

Để sáng chế có thể được hiểu dễ dàng hơn, một số thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được định nghĩa cụ thể dưới đây. Trừ khi được định nghĩa cụ thể ở bất cứ đâu trong bản mô tả này, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học khác được sử dụng ở đây có nghĩa như cách hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế thuộc về.

Như được sử dụng trong bản mô tả và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, hình thức số ít “một” bao gồm cả các dạng đề cập số nhiều trừ khi ngữ cảnh rõ ràng quy định khác.

Việc đề cập đến “hoặc” chỉ một hoặc cả hai khả năng trừ khi ngữ cảnh rõ ràng chỉ một trong hai khả năng được nêu. Trong một số trường hợp, “và/hoặc” được sử dụng để nhấn mạnh một hoặc cả hai khả năng.

Thuật ngữ “dung môi chứa nước” hoặc “điều kiện chứa nước” khi được sử dụng với dạng liên hợp, như amin hóa khử, dùng để chỉ việc sử dụng nước làm dung môi cho phản ứng liên hợp. Nước có thể chứa các chất đệm và các thành phần khác ngoại trừ việc không có dung môi hữu cơ.

Thuật ngữ “dung môi aprotic”, “dung môi DMSO” hoặc “điều kiện DMSO” khi được sử dụng với dạng liên hợp, như amin hóa khử, dùng để chỉ việc sử dụng dung môi aprotic, hoặc hỗn hợp của các dung môi aprotic, (hoặc DMSO, nếu dùng được) làm dung môi cho phản ứng liên hợp. Dung môi aprotic có thể có một số nước có mặt, ví dụ, lên đến 1%, 2%, 5%, 10% hoặc 20%.

Thuật ngữ “chứa” khi được sử dụng với chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế dùng để chỉ việc bao gồm thành phần khác bất kỳ, như chất phụ trợ và tá dược, hoặc việc bổ sung một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit-protein mà không được liệt kê một cách cụ thể. Thuật ngữ “gồm có” khi được sử dụng với hỗn hợp liên hợp polysacarit-protein đa hóa trị dùng để chỉ hỗn hợp có các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* cụ thể và không có thể liên hợp polysacarit protein *S.*

pneumoniae từ một kiểu huyết thanh khác. "Chủ yếu gồm có" và các biến thể ngữ pháp của nó chỉ việc bao gồm các phần tử bất kỳ được trích dẫn hoặc nhóm các phần tử được trích dẫn, và tùy ý bao gồm cả các thành phần khác, có bản chất tương tự hoặc bản chất khác ngoài các thành phần được trích dẫn này, mà không làm thay đổi một cách cốt yếu các tính chất cơ bản hoặc tính chất mới của chế độ liều lượng, phương pháp, hoặc chế phẩm cụ thể.

"Lượng hữu hiệu" của chế phẩm theo sáng chế dùng để chỉ liều cần phải có để có được các kháng thể làm giảm đáng kể khả năng lây nhiễm hoặc độ nghiêm trọng lây nhiễm của vi khuẩn, ví dụ, *S. pneumonia*, trong thách thức kế tiếp.

Như được sử dụng ở đây, cụm từ "được chỉ định để ngăn ngừa bệnh do phế cầu khuẩn" có nghĩa là vaccin hoặc chế phẩm sinh miễn dịch được phê duyệt bởi một hoặc nhiều cơ quan quản lý, như Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ, để phòng ngừa một hoặc nhiều bệnh gây ra bởi kiểu huyết thanh bất kỳ trong số *S. pneumoniae*, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: bệnh do phế cầu khuẩn phổ biến, bệnh viêm phổi do phế cầu khuẩn, bệnh viêm màng não do phế cầu khuẩn, bệnh nhiễm khuẩn huyết do phế cầu khuẩn, bệnh xâm lấn gây ra bởi *S. pneumoniae*, và bệnh viêm tai giữa gây ra bởi *S. pneumoniae*.

"Vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị" là dược phẩm chứa nhiều hơn một hoạt chất (ví dụ, phế cầu khuẩn nang polysacarit hoặc thể liên hợp polysacarit protein phế cầu khuẩn) mà mang lại tính miễn dịch có hoạt tính cho bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gây ra bởi nhiều hơn một kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae*.

Thuật ngữ "polysacarit" có nghĩa là bao gồm thành phần sacarit kháng nguyên (hoặc đơn vị kháng nguyên) bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực vaccin miễn dịch và vaccin vi khuẩn, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, "sacarit", "oligosacarit", "polysacarit", "liposacarit", "lipo-oligosacarit (LOS)", "lipopolysacarit (LPS)", "glycosylat", "thể liên hợp glyco" và dạng tương tự.

"PCV1", như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ vaccin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 1 chứa một thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó

kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* là 3 (như được lấy ví dụ trong ví dụ 38 và 45). Theo một số phương án cụ thể, protein mang là CRM197.

“PCV7”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 7 chứa bảy thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, mỗi thể liên hợp này chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* là: 3, 8, 9N, 11A, 19A, 15A, và 10A. Theo một số phương án cụ thể, protein mang của một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* là CRM197. Theo các phương án khác, protein mang của mỗi trong các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* là CRM197.

“PCV8”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 8 chứa tám thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, mỗi thể liên hợp này chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* là: 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, và 35B. Theo một số phương án cụ thể, protein mang của một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* là CRM197. Theo các phương án khác, protein mang của mỗi trong các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* là CRM197.

“PCV14”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 14 chứa mười bốn thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, mỗi thể liên hợp này chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* là: 3, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20, 22F và 33F. Theo một số phương án cụ thể, protein mang của một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* là CRM197. Theo các phương án khác, protein mang của mỗi trong các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* là CRM197.

“PCV15”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 15 chứa mười lăm thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, mỗi thể liên hợp này chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được

liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* là: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F. Theo một số phương án cụ thể, protein mang của một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* là CRM197. Theo các phương án khác, protein mang của mỗi trong các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* là CRM197.

“PCV16”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ vaccin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 16 chứa mười sáu thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, mỗi thể liên hợp này chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* là: 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31, và 35B, và ít nhất một trong các kiểu huyết thanh thuộc nhóm huyết thanh 15 sau: 15B, 15C, hoặc 15B được khử O-axetyl. Theo các phương án cụ thể, kiểu huyết thanh thuộc nhóm huyết thanh 15 là kiểu huyết thanh 15C hoặc 15B được khử O-axetyl. Như được thể hiện trong bản mô tả (xem ví dụ 3, dưới đây), polysacarit phế cầu khuẩn kiểu huyết thanh 15B được khử O-Axetyl tương đương với polysacarit phế cầu khuẩn kiểu huyết thanh 15C và có phổ NMR đồng nhất. Theo một số phương án cụ thể, protein mang của một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* là CRM197. Theo các phương án khác, protein mang của mỗi trong các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* là CRM197.

“PCV21”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ vaccin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 21 chứa hai mươi một thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, mỗi thể liên hợp này chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* là: 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F và 35B, và ít nhất một trong các kiểu huyết thanh thuộc nhóm huyết thanh 15 sau: 15B, 15C hoặc 15B được khử O-axetyl. Theo các phương án cụ thể, kiểu huyết thanh thuộc nhóm huyết thanh 15 là kiểu huyết thanh 15C hoặc 15B được khử O-axetyl. Theo một số phương án cụ thể, protein mang của một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* là CRM197. Theo các phương án khác,

protein mang của mỗi trong các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* là CRM197.

Kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 20A và 20B được đồng nhất (Calix, J.J. et al., J. Biol. Chem. (2012) 287(33): 27885-27894) trong nhóm huyết thanh 20 vào năm 2012 thông qua phân tích di truyền. Như được mô tả bởi Calix J.J., et al., các phương pháp xác định kiểu huyết thanh thông thường và các kháng thể bán trên thị trường không có khả năng phân biệt hai kiểu huyết thanh này từ trước và hiện cũng có ít thông tin về các nỗ lực xác định kiểu huyết thanh đối với kiểu huyết thanh 20A và 20B. Ngoài ra, tỷ lệ hiện hành bệnh của kiểu huyết thanh 20A hoặc 20B ở bệnh đã biết do nhóm huyết thanh 20 gây ra cũng không được hiểu rõ. Như vậy, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể quyết định việc chứa một hoặc cả hai kiểu huyết thanh này (20A và/hoặc 20B) trong chế phẩm vacxin *S. pneumoniae*. Cũng có thể là vacxin *S. pneumoniae* chứa một kháng nguyên polysacarit kiểu huyết thanh 20 có thể bảo vệ chéo chống lại một kháng nguyên polysacarit khác (ví dụ, vacxin chứa thể liên hợp polysacarit protein của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 20A, và không chứa kiểu huyết thanh 20B, có thể bảo vệ chéo chống lây nhiễm kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 20B). Do đó, “kiểu huyết thanh 20” như được sử dụng ở đây có thể dùng để chỉ chế phẩm chứa các thể liên hợp polysacarit protein của kiểu huyết thanh 20A và/hoặc kiểu huyết thanh 20B.

"Nucleotit chứa CpG", "oligonucleotit chứa CpG", "CpG oligonucleotit", và các thuật ngữ tương tự dùng để chỉ phân tử nucleotit có độ dài từ 6 đến 50 nucleotit chứa gốc CpG không được metyl hóa. Xem, ví dụ, Wang *et al.*, 2003, *Vaccine* 21:4297. Oligonucleotit chứa CpG bao gồm các oligonucleotit đã cải biến bằng cách sử dụng liên kết liên nucleosit tổng hợp bất kỳ, bazơ cải biến và/hoặc đường cải biến.

"Chất phụ trợ", như được định nghĩa ở đây, là chất nhằm tăng cường tính sinh miễn dịch của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế. Chất phụ trợ miễn dịch có thể làm tăng cường đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên miễn dịch yếu khi được dùng một mình, ví dụ, không cảm ứng hoặc cảm ứng ở mức yếu độ chuẩn kháng thể hoặc đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào, gia tăng độ chuẩn kháng thể đối với

kháng nguyên, và/hoặc làm giảm liều lượng kháng nguyên hữu hiệu để đạt được đáp ứng miễn dịch ở cá thể. Vì vậy, các chất bổ trợ thường được đưa vào để thúc đẩy đáp ứng miễn dịch và đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình.

"Bệnh nhân" (theo một cách khác, được đề cập trong bản mô tả này là "đối tượng") dùng để chỉ động vật có vú có khả năng bị lây nhiễm *S. pneumoniae*. Theo các phương án ưu tiên, bệnh nhân là người. Bệnh nhân có thể được điều trị phòng ngừa hoặc trị liệu. Điều trị phòng ngừa mang lại tính miễn dịch bảo vệ đủ để làm giảm khả năng hoặc độ nghiêm trọng của lây nhiễm phế cầu khuẩn hoặc các tác động của nó, ví dụ, bệnh viêm phổi do phế cầu khuẩn. Điều trị trị liệu có thể được thực hiện để làm giảm độ nghiêm trọng hoặc ngăn ngừa sự tái phát của lây nhiễm *S. pneumoniae* hoặc các tác động lâm sàng của nó. Điều trị phòng ngừa có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế, như được mô tả ở đây. Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho cả một quần thể chung hoặc cho người có nguy cơ lây nhiễm phế cầu khuẩn cao, ví dụ như người già, hoặc người sống cùng hoặc chăm sóc người già.

Đối tượng "cần điều trị" bao gồm các đối tượng được tiếp xúc hoặc lây nhiễm *S. pneumoniae* từ trước, các đối tượng được tiêm vaccin kháng *S. pneumoniae* từ trước, cũng như các đối tượng có xu hướng có lây nhiễm hoặc bất kỳ người nào mong muốn giảm khả năng lây nhiễm, ví dụ, người già, trẻ em, người lớn, hoặc cá thể khỏe mạnh thiếu sức đề kháng.

Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị "ổn định" là chế phẩm không có thay đổi đáng kể quan sát được ở nhiệt độ tủ lạnh (ví dụ, 2-8°C hoặc 4°C) trong ít nhất 1 tháng, 2 tháng, 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng và/hoặc 24 tháng. Ngoài ra, chế phẩm "ổn định" bao gồm chế phẩm thể hiện các đặc điểm mong muốn ở các nhiệt độ bao gồm ở nhiệt độ 25°C và 37°C trong khoảng thời gian bao gồm 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng, và/hoặc 24 tháng. Chỉ tiêu chấp nhận được điển hình cho tính cân bằng là như sau: độ biến thiên không lớn hơn khoảng 5%, khoảng 10%, khoảng 15%, hoặc khoảng 20% trong một hoặc nhiều trường hợp dưới đây: (a) phân tử lượng trung bình số (Mn) của thể liên hợp polysaccharit protein *S. pneumoniae* trong chế phẩm, (b) phân tử lượng trung bình trọng số (Mw) của thể liên hợp polysaccharit protein *S.*

pneumoniae trong chế phẩm, (c) tổng nồng độ polysacarit trong chế phẩm, (d) mức phát xạ lớn nhất của chế phẩm đo được bằng cách sử dụng quang phổ huỳnh quang protein nội tại ở bước sóng kích thích cụ thể, ví dụ 280 nanomet, và (e) cường độ huỳnh quang của chế phẩm đo được bằng cách sử dụng quang phổ huỳnh quang protein nội tại ở bước sóng kích thích cụ thể. Thuật ngữ “ổn định” cũng có thể được sử dụng để chỉ thể liên hợp phẩy cầu khuẩn cụ thể trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị. Khi sử dụng như vậy, thuật ngữ này dùng để chỉ thể liên hợp có các tính chất mong muốn theo thời gian, ở nhiệt độ cụ thể, và các tính chất này thay đổi không lớn hơn khoảng 5%, khoảng 10%, khoảng 15%, hoặc khoảng 20% theo thời gian và nhiệt độ được lưu ý.

II. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị

Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang. Các khía cạnh và phương án khác nhau của chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế được mô tả, dưới đây.

Theo một phương án (phương án E1), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, mỗi thể liên hợp này chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm, gồm, hoặc chủ yếu gồm có:

- (1) 15A,
- (2) 16F,
- (3) Một hoặc nhiều kiểu huyết thanh thuộc nhóm huyết thanh 23 được chọn từ: (a) 23A và 23B, (b) 23A và 23F, (c) 23B và 23F, (d) 23A, (e) 23B, và (f) 23F,
- (4) 24F,
- (5) 31, và
- (6) 35B.

Theo một phương án phụ của phương án E1, một hoặc nhiều kiểu huyết thanh thuộc nhóm huyết thanh 23 là 23A và 23B (tức là và không kiểu huyết thanh thuộc nhóm huyết thanh 23 nào khác có mặt). Theo một phương án phụ khác của phương án E1, một hoặc nhiều kiểu huyết thanh thuộc nhóm huyết thanh 23 là 23A và 23F. Theo một phương án phụ khác của phương án E1, một hoặc nhiều kiểu huyết thanh thuộc nhóm huyết thanh 23 là 23B và 23F. Theo một phương án phụ khác nữa của phương án E1, 23A là kiểu huyết thanh thuộc nhóm huyết thanh 23 duy nhất. Theo một phương án phụ khác của phương án E1, 23B là kiểu huyết thanh thuộc nhóm huyết thanh 23 duy nhất. Theo một phương án phụ khác nữa của phương án E1, 23F là kiểu huyết thanh thuộc nhóm huyết thanh 23 duy nhất.

Theo phương án thứ hai (phương án E2), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm các kiểu huyết thanh nêu trong phương án E1, hoặc phương án phụ bất kỳ của phương án E1, và còn bao gồm kiểu huyết thanh: (1) 6C, (2) 6A, hoặc (3) 6A và 6B.

Theo một phương án phụ của phương án E2, chế phẩm này chứa kiểu huyết thanh 6C. Theo một phương án phụ khác của phương án E2, chế phẩm này chứa kiểu huyết thanh 6A và 6B và không chứa kiểu huyết thanh 6C. Theo một phương án phụ khác của phương án E2, chế phẩm này chứa kiểu huyết thanh 6A.

Theo phương án thứ ba (phương án E3), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm các kiểu huyết thanh nêu trong phương án E1, hoặc phương án phụ bất kỳ của phương án E1, hoặc phương án E2, hoặc phương án phụ bất kỳ của phương án E2, và còn chứa các kiểu huyết thanh:

- (1) 8,
- (2) 9N,

- (3) 11A
- (4) 12F,
- (5) 15B hoặc 15C,
- (6) 17F, và
- (7) 20A và/hoặc 20B.

Theo phương án thứ tư (phương án E4), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* chứa các kiểu huyết thanh nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án từ E1 đến E3, hoặc phương án phụ bất kỳ của chúng, và còn chứa các kiểu huyết thanh: 10A hoặc 39.

Theo phương án thứ năm (phương án E5), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở trên, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bao gồm, gồm, hoặc chủ yếu gồm có: 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, và 35B.

Theo phương án thứ sáu (phương án E6), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở trên, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bao gồm, gồm, hoặc chủ yếu gồm có: 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, và 35B.

Theo phương án thứ bảy (phương án E7), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở trên, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bao gồm, gồm, hoặc chủ yếu gồm có: 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, và 35B.

Theo phương án thứ tám (phương án E8), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở trên, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bao gồm, gồm,

hoặc chủ yếu gồm có: 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, và 35B.

Theo phương án thứ chín (phương án E9), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở trên, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bao gồm các kiểu huyết thanh nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án từ E1 đến E8 (hoặc phương án phụ bất kỳ của chúng), và còn bao gồm các kiểu huyết thanh: 3, 7F, và 19A.

Theo phương án thứ mười (phương án E10), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở trên, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bao gồm các kiểu huyết thanh nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án từ E1 đến E9 (hoặc phương án phụ bất kỳ của chúng), và còn bao gồm kiểu huyết thanh 22F.

Theo phương án thứ mười một (phương án E11), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở trên, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bao gồm các kiểu huyết thanh nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án từ E1 đến E10 (hoặc phương án phụ bất kỳ của chúng), và còn bao gồm kiểu huyết thanh 33F.

Theo phương án thứ mười hai (phương án E12), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở trên, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bao gồm, gồm, hoặc chủ yếu gồm có tập hợp của các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm bao gồm:

- (1) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, và 35B,
- (2) 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31, và 35B,
- (3) 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31, và 35B,
- (4) 15A, 16F, 23A, 24F, 31, và 35B,
- (5) 15A, 16F, 23B, 24F, 31, và 35B,

- (6) 15A, 16F, 23F, 24F, 31, và 35B,
- (7) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, và 35B,
- (8) 6C, 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31, và 35B,
- (9) 6C, 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31, và 35B,
- (10) 6C, 15A, 16F, 23A, 24F, 31, và 35B,
- (11) 6C, 15A, 16F, 23B, 24F, 31, và 35B,
- (12) 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31, và 35B,
- (13) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, và 35B,
- (14) 6A, 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31, và 35B,
- (15) 6A, 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31, và 35B,
- (16) 6A, 15A, 16F, 23A, 24F, 31, và 35B,
- (17) 6A, 15A, 16F, 23B, 24F, 31, và 35B,
- (18) 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31, và 35B,
- (19) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, và 35B,
- (20) 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31, và 35B,
- (21) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31, và 35B,
- (22) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 24F, 31, và 35B,
- (23) 6A, 6B, 15A, 16F, 23B, 24F, 31, và 35B, và
- (24) 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31, và 35B.

Theo phương án thứ mười ba (phương án E13), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở trên, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bao gồm, gồm, hoặc chủ yếu gồm có tập hợp của các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm bao gồm:

- (1) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (2) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (3) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,

- (4) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (5) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (6) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (7) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (8) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (9) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (10) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (11) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (12) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (13) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (14) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (15) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (16) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (17) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (18) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,

- (19) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (20) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (21) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (22) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (23) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (24) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (25) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (26) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (27) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (28) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (29) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (30) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (31) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B, và
- (32) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B.

Phương án thứ mười ba (phương án E13), còn bao gồm tập hợp của các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, từ hàng (1) đến hàng (32) trong đó kiểu huyết thanh 20A trong mỗi tập hợp được thay thế bằng kiểu huyết thanh 20 hoặc kiểu huyết thanh 20B.

Theo phương án thứ mười bốn của sáng chế, (phương án E14), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở trên, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bao gồm, gồm, hoặc chủ yếu gồm có tập hợp của các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ tập hợp bất kỳ trong số các tập hợp của các kiểu huyết thanh nêu trong phương án E13, các hàng từ hàng (17) đến hàng (32), và còn bao gồm các kiểu huyết thanh 23A và/hoặc 23B.

Theo phương án thứ mười lăm (phương án E15), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở trên, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bao gồm, gồm, hoặc chủ yếu gồm có tập hợp của các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm bao gồm:

- (1) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (2) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (3) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (4) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (5) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (6) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (7) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (8) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (9) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,

- (10) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (11) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (12) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (13) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (14) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (15) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (16) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (17) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (18) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (19) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (20) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (21) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (22) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (23) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (24) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,

- (25) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (26) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (27) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (28) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (29) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (30) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (31) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (32) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (33) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B,
- (34) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A,
- (35) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B,
- (36) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B,
- (37) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A,
- (38) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B,
- (39) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20,

(40) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20,

(41) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20,

(42) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20,

(43) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20, và

(44) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20.

Theo phương án thứ mười sáu của sáng chế, (phương án E16), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở trên, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bao gồm, gồm, hoặc chủ yếu gồm có tập hợp của các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ tập hợp bất kỳ trong số các tập hợp của các kiểu huyết thanh nêu trong phương án E15, từ hàng (17) đến hàng (32), và còn bao gồm kiểu huyết thanh 23A và/hoặc 23B.

Theo phương án thứ mười bảy (phương án E17), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm:

i. 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,

ii. 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A, và

iii. 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A;

Theo các phương án phụ của phương án E17, chế phẩm sinh miễn dịch không chứa thêm bất kỳ thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* nào.

Theo phương án thứ mười tám (phương án E18), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* chứa polysacarit nang từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B. Theo các phương án phụ của phương án E18, chế phẩm sinh miễn dịch không chứa thêm bất kỳ thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* nào.

Theo phương án thứ mười chín (phương án E19), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* chứa polysacarit nang từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A. Theo các phương án phụ của phương án E19, chế phẩm sinh miễn dịch không chứa thêm bất kỳ thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* nào.

Theo phương án thứ hai mươi (phương án E20), sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* chứa polysacarit nang từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A. Theo các phương án phụ của phương án E20, chế phẩm sinh miễn dịch không chứa thêm bất kỳ thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* nào.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* chứa polysacarit nang từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A. Theo các phương án phụ của phương án này (tức là, 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A), chế phẩm sinh miễn dịch không chứa thêm bất kỳ thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* nào.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* chứa polysacarit nang từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F,

23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20. Theo các phương án phụ của phương án này (tức là, 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20), chế phẩm sinh miễn dịch không chứa thêm bất kỳ thể liên hợp polysaccharit protein *S. pneumoniae* nào.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysaccharit protein *S. pneumoniae* chứa polysaccharit nang từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B. Theo các phương án phụ của phương án này (tức là, 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B), chế phẩm sinh miễn dịch không chứa thêm bất kỳ thể liên hợp polysaccharit protein *S. pneumoniae* nào.

Như được thể hiện trong bản mô tả (xem ví dụ 3, dưới đây), polysaccharit phế cầu khuẩn kiểu huyết thanh 15B được khử O-Axetyl tương đương với polysaccharit phế cầu khuẩn kiểu huyết thanh 15C và có phổ NMR đồng nhất. Polysaccharit phế cầu khuẩn kiểu huyết thanh 15B được khử O-axetyl, như được mô tả và được bộc lộ ở đây, tương đương với polysaccharit phế cầu khuẩn kiểu huyết thanh 15C và cả hai loại polysaccharit này đều có thể có hàm lượng O-axetyl trong mỗi đơn vị lặp nằm trong khoảng từ 0 đến 5%, hoặc nằm trong khoảng từ 0 đến 4%, hoặc nằm trong khoảng từ 0 đến 3%, hoặc nằm trong khoảng từ 0 đến 2%, hoặc nằm trong khoảng từ 0 đến 1%, hoặc nằm trong khoảng từ 0 đến 0,5%, hoặc nằm trong khoảng từ 0 đến 0,1%, hoặc không có hàm lượng O-axetyl. Trong báo cáo của Spencer B.L., et al., 15C có thể được O-axetyl hóa nhẹ (Spencer, B.L. et al., Clin. Vac. Immuno. (2017) 24(8): 1-13). Vì vậy, theo phương án bất kỳ trong số các phương án của chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị ở đây, kiểu huyết thanh 15B được khử O-axetyl có thể được sử dụng thay cho kiểu huyết thanh 15C. Các quy trình khử O-axetyl là đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, như được mô tả trong tài liệu Rajam et al., *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14(9):1223–1227.

Theo một số phương án của chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế, bao gồm các phương án từ E1 đến E20 và phương án phụ bất kỳ của chúng, chế phẩm này còn chứa chất mang được dùng.

Tính phản ứng chéo

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 6C, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 6C của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng các kiểu huyết thanh 6A và 6B của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được chọn từ các phương án từ E1 đến E20 trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 6C, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 6C của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng các kiểu huyết thanh 6A và 6B của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 19A, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 19A của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 19F của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được chọn từ các phương án từ E1 đến E20 trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 19A, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 19A của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 19F của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm các kiểu huyết thanh 23A và/hoặc 23B, được liên hợp với protein mang, trong đó các

kiểu huyết thanh 23A và/hoặc 23B của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 23F của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được chọn từ các phương án từ E1 đến E20 trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm các kiểu huyết thanh 23A và/hoặc 23B, được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh 23A và/hoặc 23B của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 23F của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 6A, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 6A của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng các kiểu huyết thanh 6B và/hoặc 6C của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được chọn từ các phương án từ E1 đến E20 trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 6A, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 6A của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng các kiểu huyết thanh 6B và/hoặc 6C của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 20A, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 20A của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 20B của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được chọn từ

các phương án từ E1 đến E20 trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 20A, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 20A của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 20B của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 20B, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 20B của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 20A của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được chọn từ các phương án từ E1 đến E20 trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 20B, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 20B của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 20A của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 15C, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 15C của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 15B của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* như được chọn từ các phương án từ E1 đến E20 trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 15C, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 15C của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 15B của *S. pneumoniae*.

Protein mang

Theo các phương án cụ thể của sáng chế, CRM197 được sử dụng làm protein mang. CRM197 là biến thể không độc (tức là, toxoit) của độc tố bạch hầu có trình tự axit amin sau:

GADDVVDSSK	SFVMENFSSY	HGTPKPGYVDS	IQKGIQKPKS	GTQGNVDDDW
KEFYSTDNKY	DAAGYSVDNE	NPLSGKAGGV	VKVTYPGLTK	VLALKVDNAE
TIKKELGLSL	TEPLMEQVGT	EEFIKRFGDG	ASRVVLSLPF	AEGSSSV EYI
NNWEQAKALS	VELEINFETR	GKRGQDAMY E	YMAQACAGNR	VRRSVGSSLS
CINLDWDVIR	DKTKTKIESL	KEHGPIKNKM	SESPNKT VSE	EKAKQYLEEF
HQTALEHP EL	SELKTVTG TN	PVFAGANYAA	WAVNVAQVID	SETADNLEKT
TAALSILPGI	GSVMGIADGA	VHHNTEEIVA	QSIALSSLMV	AQAIPLVGEL
VDIGFAAYNF	VESIINLFQV	VHNSYNRPAY	SPGHKTQPFL	HDGYAVSWNT
VEDSIIRTGF	QGESGHDIKI	TAENTPLPIA	GVLLPTIPGK	LDVNKSKTHI
SVNGRKIRMR	CRAIDGDVTF	CRPKSPVYVG	NGVHANLHVA	FHRSSSEKIH
SNEISSDSIG	VLGYQKTVDH	TKVNSKLSLF	FEIKS (SEQ ID NO:1).	

Theo một phương án, CRM197 được phân lập từ các môi trường nuôi cấy của chủng *Corynebacterium diphtheria* C7 (β 197) sinh trưởng trong axit casamin và môi trường gốc dịch chiết nấm men. Theo một phương án khác, CRM197 được tạo ra theo phương pháp tái tổ hợp theo các phương pháp được mô tả trong tài liệu U.S. 5,614,382. Thông thường, CRM197 được tinh chế thông qua tổ hợp của các phương pháp lọc siêu, kết tủa amoni sulfat, và sắc ký trao đổi ion. Theo một số phương án, CRM197 được tạo ra trong *Pseudomonas fluorescens* bằng cách sử dụng công nghệ Pfenex Expression Technology™ (Pfenex Inc., San Diego, CA).

Các protein mang thích hợp khác bao gồm các độc tố vi khuẩn bất hoạt bổ sung như DT (toxoid bạch hầu) hoặc mảnh B của DT (DTFB), TT (toxoid uốn ván) hoặc mảnh C của TT, toxoid ho gà, toxoid bệnh tả (ví dụ, như được mô tả trong tài liệu WO 2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST, và exotoxin A từ *Pseudomonas aeruginosa*. Cũng có thể sử dụng các protein màng ngoài của vi khuẩn như phức hợp màng ngoài C (OMPC), porin, protein gắn kết transferrin, protein bề mặt phế cầu khuẩn A (PspA; xem WO 02/091998), protein bám dính phế cầu khuẩn (PsaA), peptidaza C5a từ liên cầu khuẩn nhóm A hoặc nhóm B, hoặc protein D *Haemophilus influenzae*, pneumolysin phế cầu khuẩn (Kuo *et al.*, 1995, *Infect Immun* 63; 2706-13) bao gồm ply được giải độc tố theo một vài cách, ví dụ, dPLY-

GMBS (xem WO 04/081515) hoặc dPLY-formol, PhtX, bao gồm PhtA, PhtB, PhtD, PhtE và các dạng dung hợp của protein Pht, ví dụ, dạng dung hợp PhtDE, dạng dung hợp PhtBE (xem WO 01/98334 và WO 03/54007). Các protein khác, như ovalbumin, protein vận chuyển keyhole limpet hemocyanin (KLH-một loại protein lớn do một loài nhuyễn thể biển sản xuất), albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin-BSA) hoặc dẫn xuất protein tinh chế của tuberculin (PPD), PorB (từ *N. meningitidis*), PD (protein D *Haemophilus influenzae*; xem, ví dụ, EP 0 594 610 B), hoặc các dạng tương đương về chức năng miễn dịch của chúng, peptit tổng hợp (xem EP0378881 và EP0427347), protein sốc nhiệt (xem WO 93/17712 và WO 94/03208), protein ho gà (xem WO 98/58668 và EP0471177), xytokin, lymphokin, các yếu tố sinh trưởng hoặc hormon sinh trưởng (xem WO 91/01146), protein nhân tạo chứa nhiều epitop tế bào T CD4⁺ ở người từ các kháng nguyên thu được từ các thể gây bệnh khác nhau (xem Falugi *et al.*, 2001, *Eur J Immunol* 31:3816-3824) như protein N19 (xem Baraldoi *et al.*, 2004, *Infect Immun* 72:4884-7), protein hấp thụ sắt (xem WO 01/72337), độc tố A hoặc B của *C. difficile* (xem WO 00/61761), và flagelin (xem Ben-Yedidia *et al.*, 1998, *Immunol Lett* 64:9) cũng có thể được sử dụng làm protein mang.

Các thể đột biến DT khác có thể được sử dụng làm protein mang, như CRM₁₇₆, CRM₂₂₈, CRM₄₅ (Uchida *et al.*, 1973, *J Biol Chem* 218:3838-3844); CRM₉, CRM₄₅, CRM₁₀₂, CRM₁₀₃ và CRM₁₀₇ và các đột biến khác được mô tả bởi Nicholls và Youle trong tài liệu Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; cải biến làm khuyết hoặc đột biến Glu-148 thành Asp, Gln hoặc Ser và/hoặc Ala 158 thành Gly và các đột biến khác được bộc lộ trong U.S. 4,709,017 hoặc U.S. 4,950,740; đột biến của ít nhất một hoặc nhiều gốc Lys 516, Lys 526, Phe 530 và/hoặc Lys 534 và các đột biến khác được bộc lộ trong Patent số U.S. 5,917,017 hoặc số U.S. 6,455,673; hoặc mảnh được bộc lộ trong tài liệu U.S. 5,843,711. Các thể đột biến DT này cũng có thể được sử dụng để tạo ra các biến thể DTFB trong đó các biến thể này chứa mảnh B chứa các vùng epitop.

Theo một số phương án, protein mang được chọn từ nhóm bao gồm: phức protein màng ngoài (OMPC), toxoit uốn ván, toxoit bạch hầu, protein D và CRM197.

Theo một số phương án của sáng chế, chất mang thứ hai có thể được sử dụng cho một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit protein trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị. Protein mang thứ hai tốt hơn là protein không độc và không tạo phản ứng và dễ thu được ở các lượng và độ tinh khiết thích hợp. Protein mang thứ hai cũng được liên hợp hoặc được kết hợp với polysacarit *S. pneumoniae* để tăng cường tính sinh miễn dịch của kháng nguyên. Các protein mang này nên dễ tuân theo các quy trình liên hợp tiêu chuẩn. Theo một phương án, mỗi polysacarit nang không liên hợp với protein mang thứ nhất được liên hợp với cùng một protein mang thứ hai (ví dụ, mỗi phân tử polysacarit nang được liên hợp với một protein mang). Theo một phương án khác, các polysacarit nang không được liên hợp với protein mang thứ nhất được liên hợp với hai hoặc nhiều hơn hai protein mang (mỗi phân tử polysacarit nang được liên hợp với một protein mang). Theo các phương án này, mỗi polysacarit nang của cùng một kiểu huyết thanh thường được liên hợp với cùng một protein mang.

Theo các phương án của sáng chế, bao gồm phương án bất kỳ trong số các phương án từ E1 đến E20 và phương án phụ bất kỳ của chúng, một hoặc nhiều (bao gồm 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, khi áp dụng) các kiểu huyết thanh polysacarit được liên hợp với CRM197. Theo các phương án khác của sáng chế, bao gồm phương án bất kỳ trong số các phương án từ E1 đến E20 và phương án phụ bất kỳ của chúng, mỗi một trong các kiểu huyết thanh polysacarit được liên hợp với CRM197.

Việc phối trộn của các thể liên hợp polysacarit-protein theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, các thể liên hợp phế cầu khuẩn riêng lẻ có thể được phối trộn với chất dẫn thuốc sinh lý dụng để bào chế chế phẩm. Các ví dụ về các chất dẫn thuốc này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước, nước muối đậm, rượu nhiều lần (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol lỏng) và dung dịch dextroza.

Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm vacxin được phối trộn trong chất đệm L-histidin với natri clorua.

Theo một số phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang và chất phụ trợ, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* là như được mô tả ở đây. Các chất phụ trợ thích hợp để tăng cường độ hiệu nghiệm của chế phẩm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở:

(1) muối nhôm (alum), như nhôm hydroxit, nhôm phosphat, nhôm sulfat, v.v.;

(2) nhũ tương phối trộn dầu trong nước (có hoặc không có các chất kích thích miễn dịch cụ thể khác như muramyl peptit (được định nghĩa dưới đây) hoặc các thành phần vách tế bào), như, ví dụ, (a) MF59 (Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 90/14837), chứa Squalen 5%, Tween 80 0,5%, và Span 85 0,5% (tùy ý chứa MTP-PE với các lượng khác nhau) được phối trộn thành các hạt cỡ dưới micron bằng cách sử dụng máy vi lỏng như máy vi lỏng Model 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, chứa Squalen 10%, Tween 80 0,4%, polyme đóng khối pluronic L121 5%, và thr-MDP được vi lỏng thành nhũ tương cỡ dưới micron hoặc được ngoáy để tạo ra nhũ tương cỡ hạt lớn hơn, (c) hệ phụ trợ Ribi™(RAS), (Corixa, Hamilton, MT) chứa Squalen 2%, Tween 80 0,2%, và một hoặc nhiều thành phần vách tế bào từ nhóm bao gồm monophosphorylipit A được 3-O-deaxyl hóa (MPL™) được mô tả trong Patent Mỹ số 4,912,094, trehaloza dimycolat (TDM), và skeleton vách tế bào (cell wall skeleton-CWS), tốt hơn là MPL+CWS (Detox™); và (d) Montanil ISA;

(3) chất phụ trợ saponin, như Quil A hoặc STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,057,540) có thể được sử dụng hoặc các hạt được tạo ra từ đó như ISCOM (phức kích thích miễn dịch được tạo ra bằng cách kết hợp cholesterol, saponin, phospholipit, và protein lưỡng

phần) và Iscomatrix® (chủ yếu có cấu trúc giống như ISCOM nhưng không có protein);

(4) lipopolysaccharit vi khuẩn, chất tương tự lipit A tổng hợp như hợp chất aminoalkyl glucosamin phosphat (AGP), hoặc các dẫn xuất hoặc chất tương tự của chúng, sẵn có từ Corixa, và được mô tả trong Patent Mỹ số 6,113,918; một AGP như vậy là 2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamino]ethyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-2-[(R)-3--tetradecanoyloxytetradecanoylamino]-b-D-glucopyranosit, còn được biết đến là 529 (trước đây được biết đến là RC529), được phối trộn dưới dạng chứa nước hoặc dưới dạng nhũ tương tổng hợp

(5) polynucleotit tổng hợp như các oligonucleotit chứa (các) môtip CpG (Patent Mỹ số 6,207,646); và

(6) xytokin, như interleukin (ví dụ, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, v.v.), interferon (ví dụ, gama interferon), yếu tố kích thích cụm khuẩn đại thực bào của bạch cầu hạt (granulocyte macrophage colony stimulating factor-GM-CSF), yếu tố kích thích cụm khuẩn đại thực bào (macrophage colony stimulating factor-M-CSF), yếu tố hoại tử khối u (tumor necrosis factor-TNF), phân tử đồng kích thích B7-1 và B7-2, v.v.; và

(7) bổ thể, như trime của thành phần bổ sung C3d.

Theo một phương án khác, chất phụ trợ là hỗn hợp của 2, 3, hoặc nhiều hơn ba chất phụ trợ nêu trên, chẳng hạn. SBAS2 (nhũ tương dầu trong nước còn chứa monophosphoryl lipit A được 3-deaxyl hóa và QS21).

Muramyl peptit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, N-axetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-axetyl-normuramyl-L-alanin-2-(1'-2' dipalmitoyl-sn-glyxero-3-hydroxyphosphoryloxy)-etylamin (MTP-PE), v.v..

Theo một số phương án, chất phụ trợ là muối nhôm. Chất phụ trợ muối nhôm có thể là vaccin được kết tủa alum hoặc vaccin được hấp thụ alum. Các chất phụ trợ muối nhôm là đã biết rõ trong lĩnh vực này và được mô tả, ví dụ, trong tài liệu

Harlow, E. and D. Lane (1988; Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory) và Nicklas, W. (1992; Aluminum salts. Research in Immunology 143:489-493). Muối nhôm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alumina được hydrat hóa, alumina hydrat, alumina trihydrat (ATH), nhôm hydrat, nhôm trihydrat, alhydrogel, Superfos, Amphogel, nhôm (III) hydroxit, nhôm hydroxyphosphat sulfat, chất phụ trợ nhôm phosphat (APA), alumina vô định hình, trialumina được hydrat hóa, hoặc trihydroxynhôm.

APA là hỗn dịch chứa nước của nhôm hydroxyphosphat. APA được sản xuất ra bằng cách trộn nhôm clorua và natri phosphat ở tỷ lệ thể tích 1:1 để kết tủa nhôm hydroxyphosphat. Sau quy trình trộn, vật liệu được giảm cỡ bằng máy trộn cắt tốc độ cao để đạt được sự phân bố theo cỡ hạt cùng cỡ. Sau đó sản phẩm này được lọc màng dựa trên nước muối sinh lý và được vô trùng bằng hơi.

Theo một số phương án, $\text{Al}(\text{OH})_3$ có bán trên thị trường (ví dụ, Alhydrogel hoặc Superfos của Denmark/Accurate Chemical and Scientific Co., Westbury, NY) được sử dụng để hấp thụ protein ở tỷ lệ từ 50 đến 200 μg protein/mg nhôm hydroxit. Theo một phương án khác, việc hấp thụ protein không phụ thuộc vào độ pI (pH đẳng điện) của protein và độ pH của môi trường. Protein có độ pI thấp hơn hấp thụ ion nhôm điện tích dương mạnh hơn so với protein có độ pI cao hơn. Các muối nhôm có thể thiết lập kho chứa kháng nguyên được giải phóng từ từ trong thời gian từ 2 đến 3 tuần, bao gồm trong quá trình hoạt hóa không đặc hiệu của các đại thực bào và quá trình hoạt hóa bổ thể, và/hoặc kích thích cơ chế miễn dịch bẩm sinh (có thể thông qua sự kích thích của axit uric). Xem, ví dụ, Lambrecht *et al.*, 2009, Curr Opin Immunol 21:23.

Các thể liên hợp chứa nước hóa trị một dạng khối thường được trộn với nhau và được pha loãng đến mục tiêu là 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ đối với tất cả các kiểu huyết thanh ngoại trừ 6B, kiểu huyết thanh này được pha loãng đến mục tiêu là 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mỗi khi được pha loãng, thì mẻ này được lọc vô trùng, và một thể tích chất phụ trợ nhôm phosphat bằng như vậy được thêm theo cách vô khuẩn để hướng đến nồng độ nhôm cuối cùng là 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mẻ đã được phối trộn và phụ trợ được làm đầy vào lọ dùng một lần dung tích 0,5mL/liều.

Theo một số phương án, chất phụ trợ là nucleotit chứa trình tự CpG, ví dụ, oligonucleotit chứa CpG, cụ thể là, oligodeoxynucleotit chứa CpG (CpG ODN). Theo một phương án khác, chất phụ trợ là ODN 1826, có thể có được từ Coley Pharmaceutical Group.

Các phương pháp sử dụng oligonucleotit CpG là đã biết rõ trong lĩnh vực này và được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Sur *et al.*, 1999, J Immunol. 162:6284-93; Verthelyi, 2006, Methods Mol Med. 127:139-58; và Yasuda *et al.*, 2006, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 23:89-110.

Theo các phương án thay thế, chế phẩm sinh miễn dịch chứa nhiều thể liên hợp polysaccharit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở đây, ví dụ, theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ E1 đến E20 hoặc phương án phụ bất kỳ của chúng, và không chứa chất phụ trợ.

Dược phẩm

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phối trộn dưới dạng lọ chứa một liều duy nhất, lọ chứa nhiều liều hoặc dưới dạng thủy tinh được làm đầy từ trước hoặc xi lanh dẹt.

Theo một phương án khác, dược phẩm theo sáng chế được dùng qua đường miệng, và từ đó được phối trộn ở dạng thích hợp để dùng qua đường miệng, tức là, dưới dạng dược phẩm rắn hoặc lỏng. Các dạng phối trộn rắn dùng qua đường miệng bao gồm viên nén, viên nang, viên tròn, hạt, viên và dạng tương tự. Các dạng phối trộn lỏng dùng qua đường miệng bao gồm dung dịch, hỗn dịch, dạng phân tán, nhũ tương, dầu và dạng tương tự.

Các chất mang được dùng cho dạng phối trộn lỏng là dung dịch chứa nước hoặc không chứa nước, hỗn dịch, nhũ tương hoặc dầu. Các ví dụ về dung môi không chứa nước là propylen glycol, polyetylen glycol, và este hữu cơ dùng để tiêm như ethyl oleat. Các chất mang chứa nước bao gồm nước, dung dịch chứa rượu/chứa nước, nhũ tương hoặc hỗn dịch, bao gồm nước muối và môi trường được đệm. Các ví dụ về dầu là dầu có nguồn gốc động vật, thực vật, hoặc tổng hợp, ví dụ, dầu lạc,

dầu đậu tương, dầu ô liu, dầu hướng hương, dầu gan cá, dầu cá khác, hoặc lipit từ sữa hoặc trứng.

Dược phẩm này có thể đẳng trương, nhược trương hoặc ưu trương. Tuy nhiên thường được ưu tiên rằng dược phẩm dùng để truyền hoặc tiêm chủ yếu là đẳng trương, khi dược phẩm này được dùng. Do đó, để bảo quản, tốt hơn là dược phẩm này có thể đẳng trương hoặc ưu trương. Nếu dược phẩm này đẳng trương để bảo quản, thì dược phẩm này có thể được pha loãng để trở thành dung dịch đẳng trương trước khi dùng.

Chất đẳng trương có thể là chất đẳng trương ion như muối hoặc chất đẳng trương không ion như hydrat cacbon. Các ví dụ về chất đẳng trương ion bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở NaCl, CaCl₂, KCl và MgCl₂. Các ví dụ về chất đẳng trương không ion bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở manitol, sorbitol và glyxerol.

Cũng được ưu tiên là ít nhất một chất phụ gia được dùng là chất đệm. Đối với một số mục đích, ví dụ, khi dược phẩm được dự định là truyền hoặc tiêm, thì thường mong đợi là dược phẩm này chứa chất đệm, có khả năng đệm dung dịch đến độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 10, như từ 5 đến 9, ví dụ, từ 6 đến 8.

Chất đệm có thể, ví dụ, được chọn từ nhóm bao gồm chất đệm TRIS, axetat, glutamat, lactat, maleat, tartrat, phosphat, xitrat, carbonat, glyxinat, histidin, glyxin, succinat và trietanolamin.

Chất đệm có thể được chọn từ chất đệm tương thích USP để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, cụ thể, khi dược phẩm này nhằm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ, chất đệm có thể được chọn từ nhóm bao gồm axit monobazơ như axit axetic, axit benzoic, axit gluconic, axit glyxeric và axit lactic; axit dibazơ như axit aconitic, axit adipic, axit ascorbic, axit carbonic, axit glutamic, axit malic, axit succinic và axit tartaric, axit polybazơ như axit xitric và axit phosphoric; và bazơ như amoniac, dietanolamin, glyxin, trietanolamin, và TRIS.

Các chất dẫn thuốc ngoài đường tiêu hóa (để tiêm dưới da, trong tĩnh mạch, trong động mạch, hoặc trong cơ) bao gồm dung dịch natri clorua, dextroza Ringer,

dextroza và natri clorua, dầu Ringer được lactat hóa và dầu không bay hơi. Chất dẫn thuốc trong tĩnh mạch bao gồm chất độn lỏng và chất độn dưỡng chất, chất độn điện phân như chất độn dựa trên dextroza Ringer, và dạng tương tự. Các ví dụ là chất lỏng vô trùng như nước và dầu, có hoặc không có sự bổ sung chất hoạt động bề mặt và các chất phụ trợ được dụng khác. Nhìn chung, nước, nước muối, dextroza chứa nước và các dung dịch đường liên quan, các glycol như propylen glycol hoặc polyetylen glycol, Polysorbat 80 (PS-80), Polysorbat 20 (PS-20), và poloxame 188 (P188) là các chất mang lỏng được ưu tiên, đặc biệt là đối với dung dịch tiêm. Các ví dụ về dầu là dầu có nguồn gốc động vật, thực vật, hoặc tổng hợp, ví dụ, dầu lạc, dầu đậu tương, dầu ô liu, dầu hương thơm, dầu gan cá, dầu cá khác, hoặc lipid từ sữa hoặc trứng.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa chất hoạt động bề mặt. Các chất hoạt động bề mặt ưu tiên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: chất hoạt động bề mặt polyoxyetylen sorbitan este (thường được đề cập đến là Tweens), đặc biệt là PS-20 và PS-80; copolyme của etylen oxit (EO), propylen oxit (PO), và/hoặc butylen oxit (BO), được bán dưới tên nhãn hiệu DOWFAX™, như copolyme khối EO/PO thẳng; octoxynol, có thể thay đổi về số lượng nhóm etoxy (oxy-1,2-etandiyli) lặp, với octoxynol-9 (Triton X-100, hoặc t-octylphenoxypolyetoxyetanol) đặc biệt được quan tâm; (octylphenoxy)polyetoxyetanol (IGEPAL CA-630/NP-40); phospholipit như phosphatidylcholin (lecithin); nonylphenol etoxylat, như lô Tergitol™ NP; ete béo polyoxyetylen thu được từ rượu laurylic, rượu xetylic, rượu stearyllic và rượu oleylic (còn được biết đến là chất hoạt động bề mặt Brij), như trietylen glycol monolauryl ete (Brij 30); và sorbitan este (còn thường được biết đến là SPAN), như sorbitan trioleat (Span 85) và sorbitan monolaurat. Chất hoạt động bề mặt được ưu tiên để có trong nhũ tương là PS-80.

Các hỗn hợp của các chất hoạt động bề mặt có thể được sử dụng, ví dụ, hỗn hợp PS-80/Span 85. Hỗn hợp của polyoxyetylen sorbitan este như polyoxyetylen sorbitan monooleat (PS-80) và octoxynol như t-octylphenoxypolyetoxyetanol (Triton X-100) cũng thích hợp. Một hỗn hợp hữu ích khác bao gồm laureth 9 cộng thêm polyoxyetylen sorbitan este và/hoặc octoxynol.

Các lượng ưu tiên của chất hoạt động bề mặt (% trọng lượng) là: polyoxyetylen sorbitan este (như PS-80) từ 0,01 đến 1%, đặc biệt là từ 0,1%; octyl- hoặc nonylphenoxy polyoxyetanol (như Triton X-100, hoặc các chất sát trùng khác trong loạt Triton) từ 0,001 đến 0,1%, đặc biệt là từ 0,005 đến 0,02%; polyoxyetylen ete (như laureth 9) từ 0,1 đến 20%, tốt hơn là từ 0,1 đến 10% và đặc biệt là từ 0,1 đến 1% hoặc khoảng 0,5%.

Theo một số phương án, dược phẩm chủ yếu chứa histidin (20mM), nước muối (150mM) và PS-20 0,2% hoặc PS-80 0,04% ở độ pH bằng 5,8 với 250µg/mL APA (chất phụ trợ nhôm phosphat). PS-20 có thể nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,3% (trọng lượng/thể tích) với sự có mặt của PS-20 hoặc PS-80 trong dược phẩm kiểm soát sự tích tụ trong quá trình sản xuất bị tác động và trong khi vận chuyển bằng cách sử dụng phương pháp đóng gói cơ bản. Theo một phương án khác, PS-20 có thể nằm trong khoảng từ 0,025% đến 0,8% (trọng lượng/thể tích). Theo một phương án khác, PS-20 có thể nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,8% (trọng lượng/thể tích). Theo một phương án khác, PS-20 có thể nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,2% (trọng lượng/thể tích). Quy trình này gồm bước kết hợp hỗn hợp của tối đa 24 kiểu huyết thanh trong histidin, nước muối, và PS-20 hoặc PS-80, sau đó kết hợp nguyên liệu đã được trộn này với APA và nước muối có hoặc không có chất bảo quản kháng khuẩn.

Theo các phương án cụ thể, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* trong các thể liên hợp polysacarit protein này chứa tập hợp bất kỳ trong số các tập hợp của các kiểu huyết thanh nêu ở đây, và còn chứa histidin 20- 80mM độ pH = 5,8 và NaCl 150mM. Theo một số phương án, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị còn chứa polysorbat 20 với lượng từ 0,2% đến 0,8% trọng lượng/thể tích.

Việc lựa chọn chất hoạt động bề mặt có thể cần phải được tối ưu hóa cho các sản phẩm thuốc và các dược chất khác nhau. Đối với các vacxin đa hóa trị có 15 hoặc nhiều hơn 15 kiểu huyết thanh, thì PS-20 và P188 được ưu tiên. Việc lựa chọn

phương pháp hóa học dùng để tạo ra thể liên hợp cũng có thể đóng vai trò quan trọng trong việc làm ổn định chế phẩm. Cụ thể, khi các phản ứng liên hợp dùng để tạo ra các thể liên hợp polysacarit protein khác nhau trong chế phẩm đa hóa trị bao gồm cả dung môi chứa nước và dung môi DMSO, thì hệ thống chất hoạt động bề mặt cụ thể tạo ra các chênh lệch tính cân bằng ý nghĩa. Tính cân bằng cải thiện của thể liên hợp polysacarit protein được phát hiện ra với một mình polysorbat 20 hoặc với poloxame 188 kết hợp với rượu nhiều lần.

Cơ chế chính xác về cách thức chất sát trùng cụ thể bảo vệ thuốc sinh học ít được biết đến và không thể được dự đoán từ trước. Các cơ chế ổn định có thể có bao gồm cơ chế hydrat hóa ưu tiên, loại trừ ưu tiên, cạnh tranh liên bề mặt không khí/chất lỏng giữa thuốc sinh học và bề mặt, độ căng bề mặt, và/hoặc sự kết hợp trực tiếp chất sát trùng với thuốc sinh học để che các miếng dán kỵ nước nhằm làm nền tích tụ.

Poloxame cũng có thể được sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế. Poloxame là copolyme ba khối không ion gồm có chuỗi kỵ nước trung tâm của polyoxypropylen (poly(propylen oxit)) có hai chuỗi ưa nước của polyoxyetylen (poly(etylen oxit)) nằm hai bên. Poloxame còn được biết đến bởi tên nhãn hiệu Pluronic®. Do độ dài của các khối polyme có thể được tùy biến, nên tồn tại nhiều poloxame khác nhau có các tính chất hơi khác nhau. Đối với thuật ngữ chung "poloxame", các copolyme này thường được đặt tên với chữ cái "P" (đối với poloxame) sau đó là ba ký tự số, hai ký tự số đầu x 100 là phân tử khối xấp xỉ của lõi polyoxypropylen, và ký tự số cuối cùng x 10 là phần trăm hàm lượng polyoxyetylen (ví dụ, P407 = poloxame có phân tử khối polyoxypropylen là 4000g/mol và hàm lượng polyoxyetylen 70%). Đối với tên nhãn hiệu Pluronic®, việc mã hóa các copolyme này bắt đầu bằng chữ cái nhằm xác định dạng vật lý của nó ở nhiệt độ trong phòng (L = lỏng, P = hồ nhão, F = vảy (cứng)) sau đó là hai hoặc ba ký tự số. Ký tự số thứ nhất (hai ký tự số trong số ba ký tự số) trong ký hiệu số, nhân với 300, chỉ phân tử lượng xấp xỉ của chất kỵ nước; và ký tự số cuối x 10 là phần trăm hàm lượng polyoxyetylen (ví dụ, L61 = Pluronic® có phân tử khối

polyoxypropylen là 1800g/mol và hàm lượng polyoxyetylen 10%). xem Patent Mỹ số 3,740,421.

Các ví dụ về poloxame có công thức tổng quát: $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$, trong đó khối a và b có các giá trị sau:

Pluronic®	Poloxame	A	B	Phân tử lượng
L31		2	16	1100 (trung bình)
L35				1900 (trung bình)
L44NF	124	12	20	từ 2090 đến 2360
L64				2900 (trung bình)
L81				2800 (trung bình)
L121				4400 (trung bình)
P123		20	70	5750 (trung bình)
F68NF	188	80	27	từ 7680 đến 9510
F87NF	237	64	37	từ 6840 đến 8830
F108NF	338	141	44	từ 12700 đến 17400
F127NF	407	101	56	từ 9840 đến 14600

Các đơn vị phân tử lượng, như được sử dụng ở đây, là tính theo Dalton (Da) hoặc g/mol.

Tốt hơn là, poloxame thường có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 1100 đến 17400Da, nằm trong khoảng từ 7500 đến 15000Da, hoặc nằm trong khoảng từ 7500 đến 10000Da. Poloxame có thể được chọn từ poloxame 188 hoặc poloxame 407. Nồng độ cuối cùng của poloxame trong các dược phẩm là nằm trong khoảng từ 0,001% đến 5% trọng lượng/thể tích, hoặc nằm trong khoảng từ 0,025% đến 1% trọng lượng/thể tích. Theo một số khía cạnh, rượu nhiều lần là propylen glycol và ở nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 1% đến 20% trọng lượng/thể tích. Theo một số khía cạnh, rượu nhiều lần là polyetylen glycol 400 và ở nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 1% đến 20% trọng lượng/thể tích.

Rượu nhiều lần thích hợp cho các dược phẩm theo sáng chế là rượu nhiều lần polyme, đặc biệt là polyete diol bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, propylen glycol và polyetylen glycol, polyetylen glycol monometyl ete. Propylen glycol là sẵn có trong khoảng phân tử lượng của monome từ ~425 đến ~2700. Polyetylen glycol và polyetylen glycol monometyl ete cũng sẵn có trong khoảng phân tử lượng nằm trong khoảng từ ~200 đến ~35000 bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở PEG200,

PEG300, PEG400, PEG1000, PEG MME 550, PEG MME 600, PEG MME 2000, PEG MME 3350 và PEG MME 4000. Polyetylen glycol được ưu tiên là polyetylen glycol 400. Nồng độ cuối cùng của rượu nhiều lần trong các dược phẩm theo sáng chế có thể nằm trong khoảng từ 1% đến 20% trọng lượng/thể tích hoặc nằm trong khoảng từ 6% đến 20% trọng lượng/thể tích.

Dược phẩm này cũng chứa dung dịch nước muối được đệm pH. Chất đệm có thể, ví dụ, được chọn từ nhóm bao gồm TRIS, axetat, glutamat, lactat, maleat, tartrat, phosphat, xitrat, carbonat, glyxinat, histidin, glyxin, succinat, HEPES (4-(axit 2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic), MOPS (axit 3-(N-morpholino)propansulfonic), MES (axit 2-(N-morpholino)etansulfonic) và chất đệm trietanolamin. Chất đệm có khả năng đệm dung dịch đến độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 10, từ 5,2 đến 7,5, hoặc từ 5,8 đến 7,0. Theo một số khía cạnh của sáng chế, chất đệm được chọn từ nhóm bao gồm phosphat, succinat, histidin, MES, MOPS, HEPES, axetat hoặc xitrat. Ngoài ra, chất đệm có thể, ví dụ, được chọn từ các chất đệm tương thích với USP để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, đặc biệt là, khi dược phẩm này là để sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Nồng độ của chất đệm nằm trong khoảng từ 1mM đến 100mM. Nồng độ của chất đệm nằm trong khoảng từ 10mM đến 80mM. Nồng độ của chất đệm nằm trong khoảng từ 1mM đến 50mM hoặc nằm trong khoảng từ 5mM đến 50mM. Theo một số khía cạnh, chất đệm là histidin ở nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 5mM đến 50mM, hoặc succinat ở nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 1mM đến 10mM. Theo một số khía cạnh, histidin ở nồng độ cuối cùng là $20\text{mM} \pm 2\text{mM}$.

Trong khi dung dịch nước muối (tức là, dung dịch chứa NaCl) được ưu tiên, thì các muối khác thích hợp để phối trộn bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, CaCl_2 , KCl và MgCl_2 và các hỗn hợp của chúng. Các chất đẳng trương không ion bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở sucroza, trehaloza, manitol, sorbitol và glyxerol có thể được sử dụng thay cho muối. Các khoảng muối thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, từ 25mM đến 500mM hoặc từ 40mM đến 170mM. Theo một khía cạnh, nước muối là NaCl, tùy ý có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20mM đến 170mM.

Theo một phương án được ưu tiên, dược phẩm chứa chất đậm L-histidin với natri clorua.

Theo một phương án khác, dược phẩm được phân phối trong hệ giải phóng có kiểm soát. Ví dụ, chất này có thể được dùng bằng cách sử dụng phương pháp truyền trong tĩnh mạch, cao dán áp da, liposom, hoặc các chế độ dùng khác. Theo một phương án khác, các vật liệu polyme được sử dụng; ví dụ, trong vi cầu hoặc mô cấy.

Lượng thể liên hợp trong mỗi liều vacxin được chọn lọc dưới dạng lượng cảm ứng đáp ứng bảo vệ miễn dịch mà không có tác động có hại đáng kể. Lượng này có thể thay đổi tùy thuộc vào kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn. Nhìn chung, đối với các thể liên hợp gốc polysacarit, mỗi liều chứa từ 0,08 đến 100 μ g mỗi polysacarit. Theo một số phương án của sáng chế, liều của mỗi thể liên hợp polysacarit nằm trong khoảng từ 0,08 đến 10 μ g. Theo các phương án khác, liều này nằm trong khoảng từ 1 đến 5 μ g, nằm trong khoảng từ 0,4 đến 4 μ g, nằm trong khoảng từ 0,4 đến 3 μ g, nằm trong khoảng từ 0,4 đến 2 μ g, hoặc nằm trong khoảng từ 0,4 đến 1 μ g. Theo một số phương án, liều của một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit là 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, hoặc 750ng hoặc 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,75, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7,5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, hoặc 100 μ g.

Theo một số phương án của dược phẩm theo sáng chế, tất cả các thể liên hợp polysacarit đều có mặt trong dược phẩm này với cùng một lượng. Theo các phương án khác, thể liên hợp polysacarit có mặt trong dược phẩm này ở các lượng khác nhau (tức là, ít nhất một thể liên hợp polysacarit có mặt ở lượng khác với một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit khác của dược phẩm).

Các lượng tối ưu của các thành phần cho một vacxin cụ thể có thể được xác định bởi các nghiên cứu tiêu chuẩn bao gồm việc quan sát các đáp ứng miễn dịch thích hợp ở các đối tượng. Ví dụ, theo một phương án khác, liều lượng tiêm chủng cho người được xác định bằng cách ngoại suy từ các nghiên cứu trên động vật sang

dữ liệu ở người. Theo một phương án khác, liều lượng này được xác định theo kinh nghiệm.

Theo một phương án, liều của muối nhôm là 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 125, 150, 200, 300, 500, hoặc 700 μ g, hoặc 1, 1,2, 1,5, 2, 3, 5mg hoặc cao hơn. Theo một phương án khác nữa, liều của muối alum được mô tả ở trên là trong mỗi μ g protein tái tổ hợp.

Dược phẩm theo sáng chế này cũng có thể chứa một hoặc nhiều protein từ *S. pneumoniae*. Các ví dụ về protein *S. pneumoniae* thích hợp để chứa bao gồm các protein được nhận biết trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 02/083855 và WO 02/053761.

Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế được dùng cho đối tượng bằng một hoặc nhiều phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như ngoài đường tiêu hóa, dưới cơ, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong da, trong mũi, dưới da, trong ổ bụng, và được phối trộn theo đó. Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế được dùng bằng cách tiêm biểu bì, tiêm trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, tiêm dưới da, hoặc tiêm trong niêm mạc đường hô hấp một chế phẩm lỏng. Dạng phối trộn lỏng để tiêm bao gồm dung dịch và dạng tương tự.

III. Phương pháp sản xuất

Polysacarit nang từ *Streptococcus pneumoniae* có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, các polysacarit có thể được phân lập từ vi khuẩn và có thể được định cỡ đến một số mức độ bằng các phương pháp đã biết (xem, ví dụ, Patent Châu Âu số EP497524 và EP497525); và tốt hơn là bằng phương pháp vi lỏng hóa được thực hiện bằng cách sử dụng máy đồng nhất hóa hoặc bằng phương pháp thủy phân hóa học. Theo một phương án, mỗi kiểu huyết thanh polysacarit phế cầu khuẩn được cho sinh trưởng trong môi trường gốc đậu nành. Sau đó các polysacarit riêng rẽ được tinh chế thông qua các bước tiêu chuẩn bao gồm ly tâm, kết tủa, và lọc siêu. Xem, ví dụ, Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2008/0286838 và Patent Mỹ số 5,847,112. Các

polysacarit có thể được định cỡ để làm giảm độ nhớt trong các mẫu polysacarit và/hoặc để cải thiện khả năng lọc cho các sản phẩm đã liên hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật như định cỡ cơ học hoặc định cỡ hóa học. Quy trình thủy phân hóa học có thể được thực hiện bằng cách sử dụng axit axetic. Quy trình định cỡ cơ học có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp cắt đồng nhất cao áp.

Các polysacarit đã tinh chế có thể được hoạt hóa hóa học để tạo ra các sacarit có khả năng phản ứng với protein mang. Các polysacarit đã tinh chế có thể được nối với tác nhân liên kết. Mỗi khi được hoạt hóa hoặc được nối với tác nhân liên kết, thì mỗi polysacarit nang được liên hợp tách biệt với protein mang để tạo ra thể liên hợp glyco. Các thể liên hợp polysacarit có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật kết hợp đã biết.

Polysacarit có thể được kết hợp với tác nhân liên kết để tạo ra hợp chất trung gian polysacarit-tác nhân liên kết trong đó các đầu tận cùng tự do của tác nhân liên kết này là nhóm este. Do đó, tác nhân liên kết là tác nhân trong đó ít nhất một đầu tận cùng là nhóm este. Đầu tận cùng còn lại được chọn lọc sao cho nó có thể phản ứng với polysacarit để tạo ra hợp chất trung gian polysacarit-tác nhân liên kết.

Polysacarit có thể được kết hợp với tác nhân liên kết bằng cách sử dụng nhóm amin bậc một trong polysacarit. Trong trường hợp này, tác nhân liên kết thường có nhóm este ở cả hai đầu tận cùng. Điều này cho phép việc ghép cặp diễn ra bằng cách cho một trong các nhóm este phản ứng với nhóm amin bậc một trong polysacarit bằng cách thế axyl ưa nhân. Phản ứng này tạo ra hợp chất trung gian polysacarit-tác nhân liên kết trong đó polysacarit được kết hợp với tác nhân liên kết này thông qua liên kết amit. Do đó, tác nhân liên kết này là tác nhân liên kết hai chức năng cung cấp nhóm este thứ nhất để phản ứng với nhóm amin bậc một trong polysacarit và cung cấp nhóm este thứ hai cho phản ứng với nhóm amin bậc một trong phân tử mang. Tác nhân liên kết điển hình là N-hydroxysuccinimide dieste của axit adipic (SIDEA).

Quy trình kết hợp cũng có thể diễn ra gián tiếp, tức là với tác nhân liên kết bổ sung dùng để tạo ra polysacarit trước khi kết hợp với tác nhân liên kết.

Polysacarit được kết hợp với tác nhân liên kết bổ sung bằng cách sử dụng nhóm carbonyl ở đầu tận cùng khử của polysacarit. Quy trình kết hợp này bao gồm hai bước: (a1) cho nhóm carbonyl phản ứng với tác nhân liên kết bổ sung; và (a2) cho đầu tận cùng tự do của tác nhân liên kết bổ sung phản ứng với tác nhân liên kết. Theo các phương án này, tác nhân liên kết bổ sung thường có nhóm amin bậc một ở cả hai đầu tận cùng, từ đó cho phép bước (a1) diễn ra bằng cách cho một trong các nhóm amin bậc một phản ứng với nhóm carbonyl trong polysacarit bằng phản ứng amin hóa khử. Nhóm amin bậc một được sử dụng trong đó nhóm này phản ứng với nhóm carbonyl trong polysacarit. Nhóm hydrazua hoặc hydroxylamino là nhóm thích hợp. Nhóm amin bậc một giống nhau thường có mặt ở cả hai đầu tận cùng của tác nhân liên kết bổ sung. Phản ứng này tạo ra hợp chất trung gian polysacarit-tác nhân liên kết bổ sung trong đó polysacarit được kết hợp với tác nhân liên kết bổ sung thông qua liên kết C—N.

Polysacarit có thể được kết hợp với tác nhân liên kết bổ sung bằng cách sử dụng một nhóm khác trong polysacarit, cụ thể là nhóm carboxyl. Quy trình kết hợp này bao gồm hai bước: (a1) cho nhóm này phản ứng với tác nhân liên kết bổ sung; và (a2) cho đầu tận cùng tự do của tác nhân liên kết bổ sung phản ứng với tác nhân liên kết. Trong trường hợp này, tác nhân liên kết bổ sung thường có nhóm amin bậc một ở cả hai đầu tận cùng, từ đó cho phép bước (a1) diễn ra bằng cách cho một trong các nhóm amin bậc một này phản ứng với nhóm carboxyl trong polysacarit bằng cách hoạt hóa EDAC. Nhóm amin bậc một được sử dụng trong đó nhóm này phản ứng với nhóm carboxyl được hoạt hóa EDAC trong polysacarit. Nhóm hydrazua là nhóm thích hợp. Nhóm amin bậc một giống nhau thường có mặt ở cả hai đầu tận cùng của tác nhân liên kết bổ sung. Phản ứng này tạo ra hợp chất trung gian polysacarit-tác nhân liên kết bổ sung trong đó polysacarit được kết hợp với tác nhân liên kết bổ sung thông qua liên kết amit.

Theo một phương án, việc hoạt hóa hóa học của các polysacarit và việc liên hợp sau đó với protein mang bằng phản ứng amin hóa khử có thể đạt được bằng các phương tiện được mô tả trong Patent Mỹ số 4,365,170, 4,673,574 và 4,902,506, Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006/0228380, 2007/184072, 2007/0231340 và

2007/0184071, và WO2006/110381, WO2008/079653, và WO2008/143709). Phương pháp hóa học có thể bao gồm việc hoạt hóa polysacarit phé cầu khuẩn bằng cách cho phản ứng với chất oxy hóa bất kỳ mà oxy hóa nhóm hydroxyl tận cùng thành aldehyt, như periodat (bao gồm natri periodat, kali periodat, hoặc axit periodic). Phản ứng này dẫn đến sự phân tách oxy hóa ngẫu nhiên của các nhóm hydroxyl lân cận của hydrat cacbon cùng với việc tạo thành nhóm aldehyt phản ứng.

Sự kết hợp với protein mang là nhờ phản ứng amin hóa khử thông qua việc amin hóa trực tiếp thành nhóm lysyl của protein. Ví dụ, việc liên hợp có thể được thực hiện bằng cách cho hỗn hợp của polysacarit hoạt hóa và protein mang phản ứng với chất khử như natri xyanoborohydrua khi có mặt niken. Phản ứng liên hợp có thể diễn ra trong dung dịch chứa nước hoặc khi có mặt DMSO. Xem, ví dụ, US2015/0231270, US2011/0195086 và EP 0471 177 B1. Sau đó, các aldehyt không phản ứng được chụp bằng cách bổ sung chất khử mạnh, như natri borohydrua.

Phản ứng amin hóa khử bao gồm hai bước, (1) oxy hóa polysacarit để tạo ra aldehyt phản ứng, (2) khử imin (bazơ Schiff) được tạo thành giữa polysacarit hoạt hóa và protein mang để tạo ra liên kết liên hợp amin ổn định. Trước khi oxy hóa, polysacarit được giảm cỡ tùy ý. Phương pháp cơ học (ví dụ, đồng nhất hóa) hoặc thủy phân hóa học có thể được sử dụng. Quy trình thủy phân hóa học có thể được thực hiện bằng cách sử dụng axit axetic. Bước oxy hóa có thể bao gồm phản ứng với periodat. Nhằm mục đích theo sáng chế, thuật ngữ "periodat" bao gồm cả periodat và axit periodic; thuật ngữ này còn bao gồm cả metaperiodat (IO_4^-) và orthoperiodat (IO_6^-) và bao gồm các muối khác nhau của periodat (ví dụ, natri periodat và kali periodat). Theo một phương án, polysacarit nang được oxy hóa khi có mặt metaperiodat, tốt hơn là khi có mặt natri periodat (NaIO_4). Theo một phương án khác, polysacarit nang được oxy hóa khi có mặt orthoperiodat, tốt hơn là khi có mặt axit periodic.

Theo một phương án, chất oxy hóa là hợp chất gốc nitroxyl hoặc nitroxit ổn định, như hợp chất piperidin-N-oxy hoặc pyrrolidin-N-oxy, khi có mặt chất oxy hóa để oxy hóa một cách chọn lọc các hydroxyl bậc một (như được mô tả trong tài liệu WO 2014/097099). Trong phản ứng này, chất oxy hóa thực tế là muối N-oxoamoni,

trong chu kỳ xúc tác. Theo một khía cạnh, hợp chất gốc nitroxyl hoặc nitroxit ổn định này là hợp chất piperidin-N-oxy hoặc pyrrolidin-N-oxy. Theo một khía cạnh, hợp chất gốc nitroxyl hoặc nitroxit ổn định này mang gốc TEMPO (2,2,6,6-tetrametyl-1-piperidinyloxy) hoặc gốc PROXYL (2,2,5,5-tetrametyl-1-pyrrolidinyloxy). Theo một khía cạnh, hợp chất gốc nitroxyl ổn định này là TEMPO hoặc dẫn xuất của nó. Theo một khía cạnh, chất oxy hóa này là phân tử mang gốc N-halo. Theo một khía cạnh, chất oxy hóa này được chọn từ nhóm bao gồm N-closucxinimit, N-Bromosucxinimit, N-Iodosucxinimit, axit dicloisoxyanuric, 1,3,5-triclo-1,3,5-triazinan-2,4,6-trion, axit dibromoisoxyanuric, 1,3,5-tribromo-1,3,5-triazinan-2,4,6-trion, axit diiodoisoxyanuric và 1,3,5-triiodo-1,3,5-triazinan-2,4,6-trion. Tốt hơn là chất oxy hóa này là N-closucxinimit.

Theo một số khía cạnh, chất oxy hóa là gốc tự do 2,2,6,6-Tetrametyl-1-piperidinyloxy (TEMPO) và N-closucxinimit (NCS) làm chất đồng oxy hóa (như được mô tả trong tài liệu WO 2014/097099). Do đó, theo một khía cạnh, các thể liên hợp glyco từ *S. pneumoniae* có thể thu được bằng phương pháp bao gồm các bước: a) cho sacarit phản ứng với 2,2,6,6-tetrametyl-1-piperidinyloxy (TEMPO) và N-closucxinimit (NCS) trong dung môi chứa nước để tạo ra sacarit hoạt hóa; và b) cho sacarit hoạt hóa này phản ứng với protein mang chứa một hoặc nhiều nhóm amin (sau đây phương pháp này được ký hiệu là "TEMPO/NCS-amin hóa khử").

Tùy ý, phản ứng oxy hóa được dập tắt bằng cách bổ sung chất dập tắt. Chất dập tắt này có thể được chọn từ các diol lân cận, 1-,2-aminoalcohol, axit amin, glutathion, sulfat, bisulfat, dithionit, metabisulfat, thiosulfat, phosphit, hypophosphit hoặc axit phospho (như glyxerol, etylen glycol, propan-1-,2-diol, butan-1,2-diol hoặc butan-2,3-diol, axit ascorbic).

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra thể liên hợp polysacarit-protein *Streptococcus pneumoniae* kiểu huyết thanh 8 bằng cách sử dụng phản ứng liên hợp trong dung môi aprotic, trong đó phản ứng liên hợp này không sử dụng xyanoborohydrua. Theo các phương án khác, phản ứng liên hợp là phản ứng khử bazơ Schiff hoặc phản ứng amin hóa khử. Theo các phương án khác, protein là toxoit uốn ván, toxoit bạch hầu, hoặc CRM197. Theo các phương án khác nữa,

protein là CRM197. Theo các phương án khác, phản ứng liên hợp là phản ứng amin hóa khử. Theo các phương án khác, phản ứng amin hóa khử được thực hiện trong dimethylsulfoxit (DMSO).

Theo một số phương án, polysacarit đã oxy hóa trước khi liên hợp có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 30kDa đến 1000kDa. Phân tử lượng có thể được tính bằng phương pháp sắc ký loại trừ kích cỡ (size exclusion chromatography-SEC) kết hợp với bộ dò tán xạ ánh sáng nhiều góc (multiangle light scattering-MALS) và bộ dò chỉ số khúc xạ (refractive index-RI). Theo một số phương án, polysacarit có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 50kDa đến 300kDa. Theo một số phương án, polysacarit có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 50kDa đến 1000kDa. Theo các phương án bổ sung, polysacarit có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 70kDa đến 900kDa. Theo các phương án khác, polysacarit có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 100kDa đến 800kDa. Theo các phương án khác, polysacarit có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 200kDa đến 600kDa. Theo các phương án khác, polysacarit có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 100kDa đến 1000kDa; từ 100kDa đến 900kDa; từ 100kDa đến 800kDa; từ 100kDa đến 700kDa; từ 100kDa đến 600kDa; từ 100kDa đến 500kDa; từ 100kDa đến 400kDa; từ 100kDa đến 300kDa; từ 150kDa đến 1000kDa; từ 150kDa đến 900kDa; từ 150kDa đến 800kDa; từ 150kDa đến 700kDa; từ 150kDa đến 600kDa; từ 150kDa đến 500kDa; từ 150kDa đến 400kDa; từ 150kDa đến 300kDa; từ 200kDa đến 1000kDa; từ 200kDa đến 900kDa; từ 200kDa đến 800kDa; từ 200kDa đến 700kDa; từ 200kDa đến 600kDa; từ 200kDa đến 500kDa; từ 200kDa đến 400kDa; từ 200kDa đến 300; từ 250kDa đến 1000kDa; từ 250kDa đến 900kDa; từ 250kDa đến 800kDa; từ 250kDa đến 700kDa; từ 250kDa đến 600kDa; từ 250kDa đến 500kDa; từ 250kDa đến 400kDa; từ 250kDa đến 350kDa; từ 300kDa đến 1000kDa; từ 300kDa đến 900kDa; từ 300kDa đến 800kDa; từ 300kDa đến 700kDa; từ 300kDa đến 600kDa; từ 300kDa đến 500kDa; từ 300kDa đến 400kDa; từ 400kDa đến 1000kDa; từ 400kDa đến 900kDa; từ 400kDa đến 800kDa; từ 400kDa đến 700kDa; từ 400kDa đến 600kDa; từ 500kDa đến 600kDa.

Bước thứ hai của quy trình liên hợp là liên kết khử imin (bazơ Schiff) giữa polysacarit hoạt hóa và protein mang để tạo ra liên kết liên hợp ổn định (còn được

gọi là amin hóa khử), bằng cách sử dụng chất khử. Các chất khử thích hợp bao gồm xyanoborohydrua (như natri xyanoborohydrua hoặc natri borohydrua). Theo một phương án, chất khử là natri xyanoborohydrua.

Theo một số phương án, phản ứng amin hóa khử được thực hiện trong dung môi aprotic (hoặc hỗn hợp của các dung môi aprotic). Theo một phương án, phản ứng khử được thực hiện trong DMSO hoặc trong dung môi DMF (dimethylformamit). Dung môi DMSO hoặc DMF có thể được sử dụng để hoàn nguyên polysacarit hoạt hóa và protein mang, nếu được làm khô lạnh. Theo một phương án, dung môi aprotic là DMSO.

Ở cuối phản ứng khử, có thể có các nhóm aldehyt không phản ứng còn lại trong thể liên hợp, mà có thể được chụp bằng cách sử dụng chất chụp thích hợp. Theo một phương án, chất chụp này là natri borohydrua (NaBH_4). Các chất thay thế thích hợp bao gồm natri triaxetoxymetabolit borohydrua hoặc natri hoặc kẽm borohydrua khi có mặt axit Bronsted hoặc axit Lewis), amin boran như pyridin boran, 2-Picolin boran, 2,6-diboran-metanol, dimethylamin-boran, $t\text{-BuMe'PrN-BH}_3$, benzylamin- BH_3 hoặc 5-etyl-2-metylpyridin boran (PEMB) hoặc nhựa trao đổi borohydrua. Sau khi liên hợp (phản ứng khử và tùy ý bước chụp), thì các thể liên hợp glyco có thể được tinh chế (được làm giàu đối với một lượng thể liên hợp polysacarit-protein) bằng các kỹ thuật khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình. Các kỹ thuật này bao gồm thẩm tách, thao tác cột/lọc màng, lọc dòng tiếp tuyến, kết tủa/rửa giải, sắc ký cột (sắc ký trao đổi ion, sắc ký trao đổi ion nhiều chế độ, DEAE, hoặc sắc ký tương tác kỵ nước), và lọc theo độ sâu. Theo một phương án, thể liên hợp glyco được tinh chế bằng phương pháp lọc màng hoặc sắc ký trao đổi ion hoặc phương pháp sắc ký loại trừ kích cỡ.

Các thể liên hợp glyco được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic thường được sử dụng trong các vacxin liên hợp phế cầu khuẩn đa hóa trị. Vì vậy, theo một số phương án cho chế phẩm đa hóa trị trong đó không phải tất cả các kiểu huyết thanh đều được tạo ra trong dung môi aprotic, thì phản ứng khử đối với các kiểu huyết thanh còn lại được thực hiện trong dung môi chứa nước (ví dụ, được chọn từ PBS (nước muối đệm phosphat), MES (axi 2-(*N*-

morpholino)etansulfonic), HEPES (axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic), Bis-tris, ADA (axit N-(2-Acetamido)iminodiacetic), PIPES (axit piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonic)), MOPSO (axit 3-Morpholino-2-hydroxypropansulfonic), BES (axit N,N-bis(2-hydroxyetyl)-2-aminoetansulfonic), MOPS (axit 3-(N-morpholino)propansulfonic), DIPSO (axit 3-Bis(2-hydroxyetyl) amino-2-hydroxypropan-1-sulfonic), MOBS (axit 4-(N-morpholino)butansulfonic), HEPPSO (axit N-(2-Hydroxyetyl)piperazin-N-(2-hydroxypropansulfonic)), POPSO (axit piperazin-1,4-bis(2-hydroxy-3-propansulfonic)), TEA (trietanolamin), EPPS (axit 4-(2-Hydroxyetyl)piperazin-1-propansulfonic), Bixin ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,5, từ 7,0 đến 8,0, hoặc từ 7,0 đến 7,5).

Thể liên hợp polysacarit-protein nang *S. pneumonia* có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kiểu huyết thanh: 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B, và 39. Thể liên hợp polysacarit-protein nang *S. pneumonia* có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp amin hóa khử trong dung môi aprotic, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kiểu huyết thanh: 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B, và 39. Thể liên hợp polysacarit-protein nang *S. pneumonia* có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp amin hóa khử trong dung môi aprotic, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kiểu huyết thanh: 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B, và 39. Các polysacarit có thể được sử dụng dưới dạng oligosacarit. Các polysacarit này được tạo thành một cách thuận lợi bằng cách tạo mảnh polysacarit đã tinh chế (ví dụ, bằng cách thủy phân), mà thường sau đó là tinh chế các mảnh có kích cỡ mong muốn.

Theo một số phương án, các thể liên hợp polysacarit-protein phế cầu khuẩn thuộc một hoặc nhiều kiểu huyết thanh 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B, và 39 được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic.

Theo một số phương án, các thể liên hợp polysacarit-protein phế cầu khuẩn thuộc một hoặc nhiều kiểu huyết thanh 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B, và 39 được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic. Theo một số phương án, các thể liên hợp polysacarit-protein phế cầu khuẩn thuộc một hoặc nhiều kiểu huyết thanh 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B, và 39 được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic. Theo một số phương án, mỗi trong các kiểu huyết thanh trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic. Theo một số phương án, các polysacarit thuộc một hoặc nhiều kiểu huyết thanh trong chế phẩm đa hóa trị được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic và các polysacarit thuộc một hoặc nhiều kiểu huyết thanh được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi chứa nước. Theo một số phương án, các polysacarit thuộc hai hoặc nhiều hơn hai kiểu huyết thanh trong chế phẩm đa hóa trị được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic. Theo các phương án khác, các polysacarit thuộc ba hoặc nhiều hơn ba, bốn hoặc nhiều hơn bốn, năm hoặc nhiều hơn năm, sáu hoặc nhiều hơn sáu, bảy hoặc nhiều hơn bảy, tám hoặc nhiều hơn tám, chín hoặc nhiều hơn chín, mười hoặc nhiều hơn mười, mười một hoặc nhiều hơn mười một, mười hai hoặc nhiều hơn mười hai, mười ba hoặc nhiều hơn mười ba, mười bốn hoặc nhiều hơn mười bốn, mười lăm hoặc nhiều hơn mười lăm, mười sáu hoặc nhiều hơn mười sáu, mười bảy hoặc nhiều hơn mười bảy, mười tám hoặc nhiều hơn mười tám, mười chín hoặc nhiều hơn mười chín, hai mươi hoặc nhiều hơn hai mươi, hoặc hai mươi một hoặc nhiều hơn hai mươi một kiểu huyết thanh trong chế phẩm đa hóa trị được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic. Theo một số phương án, các polysacarit từ một hoặc nhiều kiểu huyết thanh trong chế phẩm đa hóa trị được liên hợp bằng cách sử dụng các hóa học khác có thể trong dung môi aprotic hoặc trong dung môi chứa nước.

Vì vậy, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, mỗi thể liên hợp này chứa

polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* là như được mô tả ở đây (tức là trong phần II, “chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị”), trong đó phản ứng liên hợp mà từ đó polysacarit từ một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit protein được liên hợp với protein mang là trong dung môi aprotic. Theo một số phương án, ít nhất 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, hoặc 100% các kiểu huyết thanh trong chế phẩm đa hóa trị được tạo ra trong dung môi aprotic. Phần còn lại của các kiểu huyết thanh được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp hóa học thay thế và/hoặc trong dung môi chứa nước.

Xác định được rằng việc sử dụng DMSO làm dung môi trong quá trình amin hóa khử các thể liên hợp polysacarit-protein dẫn đến tính cân bằng tốt hơn ngoài mong đợi và tính sinh miễn dịch tăng cường đối với các kiểu huyết thanh đó so với cùng các thể liên hợp được tạo ra trong điều kiện chứa nước (xem đơn sáng chế Mỹ số 62/463,216 và 62/555,444). Như được thể hiện trong bản mô tả (xem, ví dụ 40), dạng phối trộn sản phẩm thuốc chứa các thể liên hợp phế cầu khuẩn theo sáng chế được bào chế bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ, DMSO) dẫn đến tính cân bằng vật lý và hóa học tốt hơn so với vaccin sử dụng các dược chất được bào chế bằng cách sử dụng dung môi protic (tức là chứa nước) trong phản ứng amin hóa khử trong quy trình liên hợp. Vì vậy, theo một số phương án, tất cả các thể liên hợp polysacarit phế cầu khuẩn trong chế phẩm đa hóa trị được tạo ra trong dung môi aprotic.

Theo một số phương án của sáng chế, tổng nồng độ polysacarit trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 0,02 đến khoảng 0,175mg/mL. Theo một số phương án của sáng chế, tổng nồng độ polysacarit trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 0,03 đến khoảng 0,175mg/mL. Theo một số phương án của sáng chế, tổng nồng độ polysacarit trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 0,04 đến khoảng 0,175mg/mL. Theo các phương án khác, tổng nồng độ polysacarit trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 0,065 đến khoảng 0,085mg/mL, từ khoảng 0,070 đến khoảng 0,080mg/mL, từ khoảng 0,065 đến khoảng 0,080mg/mL, từ khoảng 0,070 đến khoảng 0,085mg/mL, từ khoảng 0,110 đến khoảng 0,128mg/mL, từ khoảng 0,110

đến khoảng 0,175mg/mL, từ khoảng 0,10 đến khoảng 0,175mg/mL, từ khoảng 0,110 đến khoảng 0,170mg/mL, từ khoảng 0,115 đến khoảng 0,15mg/mL, từ khoảng 0,110 đến khoảng 0,15mg/mL, từ khoảng 0,110 đến khoảng 0,125mg/mL, từ khoảng 0,150 đến khoảng 0,170mg/mL, từ khoảng 0,150 đến khoảng 0,165mg/mL, từ khoảng 0,140 đến khoảng 0,170mg/mL, từ khoảng 0,130 đến khoảng 0,170mg/mL, từ khoảng 0,150 đến khoảng 0,175mg/mL, từ khoảng 0,070 đến khoảng 0,170mg/mL, từ khoảng 0,065 đến khoảng 0,175mg/mL, hoặc từ khoảng 0,065 đến khoảng 0,180mg/mL.

Theo các phương án của sáng chế trong đó một hoặc nhiều, hoặc tất cả các thể liên hợp polysacarit-protein trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được tạo ra trong dung môi aprotic, tổng nồng độ polysacarit trong chế phẩm ổn định trong 4 tuần hoặc hơn 4 tuần ở nhiệt độ 37°C, 4 tuần hoặc hơn 4 tuần ở nhiệt độ 25°C, và 12 tuần hoặc hơn 12 tuần ở nhiệt độ 4°C.

Theo một số phương án của sáng chế trong đó một hoặc nhiều, hoặc tất cả các thể liên hợp polysacarit-protein trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được tạo ra trong dung môi aprotic, thì phân tử lượng trung bình trọng số (Mw) của tất cả các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong chế phẩm (giá trị trung bình của tất cả các thể liên hợp trong chế phẩm) nằm trong khoảng từ 3500 đến khoảng 4700kDa, nằm trong khoảng từ 3500 đến khoảng 4600kDa, nằm trong khoảng từ 3500 đến khoảng 4500kDa, nằm trong khoảng từ 3500 đến khoảng 4400kDa, nằm trong khoảng từ 3500 đến khoảng 4300kDa, nằm trong khoảng từ 3500 đến khoảng 4200kDa, nằm trong khoảng từ 3600 đến khoảng 4700kDa, nằm trong khoảng từ 3600 đến khoảng 4600kDa, nằm trong khoảng từ 3600 đến khoảng 4500kDa, nằm trong khoảng từ 3600 đến khoảng 4400kDa, nằm trong khoảng từ 3600 đến khoảng 4300kDa, nằm trong khoảng từ 3600 đến khoảng 4200kDa, nằm trong khoảng từ 3700 đến khoảng 4700kDa, nằm trong khoảng từ 3700 đến khoảng 4600kDa, nằm trong khoảng từ 3700 đến khoảng 4500kDa, nằm trong khoảng từ 3700 đến khoảng 4400kDa, nằm trong khoảng từ 3700 đến khoảng 4300kDa, nằm trong khoảng từ 3700 đến khoảng 4200kDa, nằm trong khoảng từ 3800 đến khoảng 4700kDa, nằm trong khoảng từ 3800 đến khoảng 4600kDa, nằm trong khoảng từ

3800 đến khoảng 4500kDa, nằm trong khoảng từ 3800 đến khoảng 4400kDa, nằm trong khoảng từ 3800 đến khoảng 4300kDa, nằm trong khoảng từ 3800 đến khoảng 4200kDa, nằm trong khoảng từ 3900 đến khoảng 4700kDa, nằm trong khoảng từ 3900 đến khoảng 4600kDa, nằm trong khoảng từ 3900 đến khoảng 4500kDa, nằm trong khoảng từ 3900 đến khoảng 4400kDa, nằm trong khoảng từ 3900 đến khoảng 4300kDa, hoặc nằm trong khoảng từ 3900 đến khoảng 4200kDa.

Theo một số phương án của sáng chế trong đó các thể liên hợp polysacarit-protein trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được tạo ra trong dung môi aprotic, thì Mw của mỗi một trong các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong chế phẩm này (đối với một kiểu huyết thanh đơn lẻ) nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 10000kDa, nằm trong khoảng từ 1500 đến khoảng 5500kDa, nằm trong khoảng từ 1500 đến khoảng 5600kDa, nằm trong khoảng từ 1500 đến khoảng 5700kDa, nằm trong khoảng từ 1500 đến khoảng 5800kDa, nằm trong khoảng từ 1500 đến khoảng 5900kDa, nằm trong khoảng từ 1500 đến khoảng 6000kDa, nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 5500kDa, nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 5000kDa, nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 4000kDa, nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 4500kDa, nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 4000kDa, hoặc nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 3500kDa. Theo các phương án khác, Mw của thể liên hợp từ một kiểu huyết thanh đơn lẻ trong chế phẩm là khoảng 1000kDa, khoảng 1100kDa, khoảng 1200kDa, khoảng 1300kDa, khoảng 1400kDa, khoảng 1500kDa, khoảng 1600kDa, khoảng 1700kDa, khoảng 1800kDa, khoảng 1900kDa, khoảng 2000kDa, khoảng 2100kDa, khoảng 2200kDa, khoảng 2300kDa, khoảng 2400kDa, khoảng 2500kDa, khoảng 2600kDa, khoảng 2700kDa, khoảng 2800kDa, khoảng 2900kDa, khoảng 3000kDa, khoảng 3100kDa, khoảng 3200kDa, khoảng 3300kDa, khoảng 3400kDa, khoảng 3500kDa, khoảng 3600kDa, khoảng 3700kDa, khoảng 3800kDa, khoảng 3900kDa, khoảng 4000kDa, khoảng 4100kDa, khoảng 4200kDa, khoảng 4300kDa, khoảng 4400kDa, khoảng 4500kDa, khoảng 4600kDa, khoảng 4700kDa, khoảng 4800kDa, khoảng 4900kDa, khoảng 5000kDa, khoảng 5100kDa, khoảng 5200kDa, khoảng 5300kDa, khoảng 5400kDa, hoặc khoảng 5500kDa.

Theo một số phương án của sáng chế, các thể liên hợp polysacarit-protein trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được tạo ra trong dung môi aprotic. Các chế phẩm chứa phần trăm cao hơn của polysacarit *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang trong dung môi aprotic (như đối lập với được tạo ra trong dung môi protic) có thể được ưu tiên. Theo một số phương án, phần trăm (như được tính bằng số lượng các kiểu huyết thanh polysacarit được tạo ra trong dung môi aprotic chia cho tổng số lượng các kiểu huyết thanh polysacarit, trong đó tổng số lượng bao gồm số lượng được tạo ra trong dung môi aprotic hoặc dung môi protic) của thể liên hợp đặc hiệu kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được tạo ra trong dung môi aprotic có thể lớn hơn 50%, hoặc lớn hơn 60%, hoặc lớn hơn 70%, hoặc lớn hơn 80%, hoặc lớn hơn 90% hoặc bằng 100%.

Theo một số phương án của sáng chế, thể liên hợp polysacarit-protein kiểu huyết thanh 3 trong chế phẩm được tạo ra trong dung môi aprotic và Mw của thể liên hợp này nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 5000kDa, hoặc nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 4000kDa, hoặc nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 3000kDa, hoặc nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 2500kDa, hoặc nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 2000kDa.

Theo một số phương án của sáng chế trong đó một hoặc nhiều, hoặc tất cả các thể liên hợp polysacarit-protein trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được tạo ra trong dung môi aprotic, thì phân tử lượng trung bình số (Mn) của các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong chế phẩm này (trung bình của tất cả các thể liên hợp trong chế phẩm này) nằm trong khoảng từ 900 đến khoảng 3000kDa, nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 3000kDa, nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 2500kDa, nằm trong khoảng từ 1500 đến khoảng 2500kDa, nằm trong khoảng từ 1800 đến khoảng 2500kDa, nằm trong khoảng từ 1900 đến khoảng 2500kDa, hoặc nằm trong khoảng từ 2000 đến khoảng 2500kDa.

Theo một số phương án của sáng chế trong đó một hoặc nhiều, hoặc tất cả các thể liên hợp polysacarit-protein trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được tạo ra trong dung môi aprotic, Mn của mỗi trong các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong chế phẩm này (đối với một kiểu huyết thanh đơn lẻ) nằm trong

khoảng từ 700 đến khoảng 7000kDa, nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 6000kDa, nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 5000kDa, nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 4000kDa, nằm trong khoảng từ 1000 đến khoảng 3000kDa, nằm trong khoảng từ 900 đến khoảng 5500kDa, nằm trong khoảng từ 900 đến khoảng 5000kDa, nằm trong khoảng từ 900 đến khoảng 4500kDa, nằm trong khoảng từ 900 đến khoảng 4000kDa, nằm trong khoảng từ 900 đến khoảng 3500kDa, hoặc nằm trong khoảng từ 900 đến khoảng 3000kDa.

Theo các phương án của sáng chế, Mw và/hoặc Mn của các thể liên hợp polysaccharit protein *S. pneumoniae* trong chế phẩm ổn định trong 4 tuần hoặc hơn 4 tuần ở nhiệt độ 37°C, 4 tuần hoặc hơn 4 tuần ở nhiệt độ 25°C, và/hoặc 12 tuần hoặc hơn 12 tuần ở nhiệt độ 4°C.

Theo các phương án của sáng chế, nồng độ polysaccharit, Mw, và/hoặc Mn được xác định bằng cách sử dụng HPSEC UV/MALS/RI.

Theo một số phương án của sáng chế, trong đó một hoặc nhiều, hoặc tất cả các thể liên hợp polysaccharit-protein trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được tạo ra trong dung môi aprotic, mức phát xạ lớn nhất của chế phẩm được đo bằng cách sử dụng quang phổ huỳnh quang protein nội tại với bước sóng kích thích ở 280 nanomet (nm) nằm trong khoảng từ 335nm đến khoảng 342nm. Theo một số phương án, mức phát xạ lớn nhất vẫn nằm trong khoảng từ 335nm đến khoảng 342nm và cường độ huỳnh quang ổn định trong ít nhất 1 tuần ở nhiệt độ 37°C. Theo một số phương án, mức phát xạ lớn nhất vẫn nằm trong khoảng từ 335nm đến khoảng 342nm và cường độ huỳnh quang ổn định trong 1 tuần ở nhiệt độ 37°C.

Theo một số phương án, tất cả các thể liên hợp polysaccharit phế cầu khuẩn trong chế phẩm đa hóa trị được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong DMSO. Theo một số phương án phụ, chế phẩm đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysaccharit mà tất cả đều được tạo ra bằng cách sử dụng DMSO không chứa chất phụ trợ.

Không bị giới hạn ở bất kỳ lý thuyết nào, một cơ chế có thể có cho tính sinh miễn dịch tăng cường được quan sát cùng với thể liên hợp glyco được tạo ra trong

DMSO bao gồm số lượng liên kết gia tăng giữa hydrat cacbon (polysacarit nang) và gốc lysin trên bề mặt của protein mang mà sẽ tạo ra các điểm gắn bổ sung giữa protein và polysacarit để tạo ra tính cân bằng và sự khử polyme hóa hóa học đối lập hoặc sự phá vỡ liên kết peptit hydrat cacbon. Xem, ví dụ, HHSieh, Characterization of Saccharide-CRM197 Conjugate Vaccines in Brown F, Corbel M, Griffiths E (eds): Physico-Chemical Procedures for the Characterization of Vaccines. Dev. Biol. Basel, Karger, 2000, vol 103, pp. 93-104. Một lợi ích nữa của liên kết polysacarit-protein gia tăng được tạo ra trong quá trình liên hợp trong dung môi DMSO có thể là các cơ hội khác nữa để trình diện thành công peptit-hydrat cacbon vào các tế bào T. Có thể hiểu rằng, do tính biến đổi di truyền trong quần thể người dẫn đến việc thay đổi khả năng và độ nhạy cảm tải nạp hoặc kết hợp với các trình tự peptit cụ thể được liên hợp với các kháng nguyên hydrat cacbon, mà các điểm gắn bổ sung trên protein mang sẽ cho phép gia tăng cơ hội trình diện kháng nguyên thành công ở bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên (APC) để cho phép đáp ứng phụ thuộc vào tế bào T đối với một kháng nguyên không phụ thuộc vào tế bào T khác. Một cơ chế sinh miễn dịch gia tăng có thể có khác được quan sát bằng cách liên hợp trong dung môi DMSO có thể là do sự biến tính của CRM197 trong dung môi hữu cơ, mà để lộ các lysin bổ sung cho liên kết polysacarit mang lại cơ hội trình diện glycopeptit gia tăng ở bề mặt của APC đối với đáp ứng phụ thuộc vào tế bào T đối với các peptit epitop khác nhau. Xem Avci *et al.*, 2011, Nature Medicine 17: 1602-1610.

Một lợi ích khác nữa của việc liên hợp trong dung môi hữu cơ tạo CRM197 biến tính trong các thể liên hợp có thể là sự giảm can thiệp miễn dịch của kháng thể kháng các epitop CRM197 tự nhiên. Một lợi ích khác của liên kết polysacarit-protein gia tăng được tạo ra trong quá trình liên hợp trong dung môi DMSO có thể là việc tạo thành các thể liên hợp polysacarit protein cỡ lớn hơn dẫn đến gia tăng tính sinh miễn dịch. Dược phẩm theo sáng chế được tin là mang lại lợi ích đáng kể trong việc tạo ra đáp ứng ở người.

Theo một số phương án, phản ứng liên hợp được thực hiện bằng phản ứng amin hóa khử trong đó niken được sử dụng để phản ứng liên hợp có hiệu quả cao

hơn và hỗ trợ loại bỏ xyanua tự do. Các kim loại chuyển tiếp đã biết là tạo ra các phức ổn định với xyanua và đã biết là cải thiện sự kim loại hóa khử của nhóm protein amino và formaldehyt với natri xyanoborohydrua (S Gidley *et al.*, *Biochem J.* 1982, 203: 331-334; Jentoft *et al.* *Anal Biochem.* 1980, 106: 186-190). Bằng cách tạo phức xyanua ức chế còn dư, thì việc bổ sung niken làm tăng sự tiêu thụ protein trong quá trình liên hợp và dẫn đến việc tạo thành các thể liên hợp sinh miễn dịch có hoạt lực hơn, lớn hơn.

Chênh lệch ở các mức xyanua ban đầu trong loạt chất phản ứng natri xyanoborohydrua cũng dẫn đến tính liên hợp không nhất quán, dẫn đến thuộc tính sản phẩm thay đổi, như kích cỡ thể liên hợp và tỷ lệ liên hợp Ps với CRM197. Việc bổ sung niken làm giảm sự liên hợp không nhất quán bằng cách tạo phức xyanua, loại bỏ các chênh lệch trong loạt các natri xyanoborohydrua.

Các phương pháp hóa học thay thế thích hợp bao gồm phương pháp hoạt hóa sacarit bằng 1-xyano-4-dimethylamino pyridini tetraflorurat (CDAP) để tạo ra xyanat este. Từ đó, sacarit hoạt hóa có thể được kết hợp một cách trực tiếp hoặc thông qua nhóm đoạn đệm (tác nhân liên kết) với nhóm amino trên protein mang. Ví dụ, đoạn đệm có thể là xystamin hoặc xysteamin để thu được polysacarit được thiol hóa mà có thể được kết hợp với chất mang thông qua liên kết thioete thu được sau phản ứng với protein mang hoạt hóa bằng maleimit (ví dụ, bằng cách sử dụng GMBS) hoặc protein mang được haloaxetyl hóa (ví dụ, bằng cách sử dụng iodoaxetimit [ví dụ, etyl iodoaxetimit HCl] hoặc N-succinimidyl bromoaxetat hoặc SIAB, hoặc SIA, hoặc SBAP). Tốt hơn là, xyanat este (tùy ý được tạo ra bởi hóa học CDAP) được kết hợp với hexan diamin hoặc dihydrazua của axit adipic (ADH) và sacarit dẫn xuất từ amino được liên hợp với protein mang bằng cách sử dụng hóa học carbodiimit (ví dụ, EDAC hoặc EDC) thông qua nhóm carboxyl trên protein mang. Các thể liên hợp này được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 93/15760, WO 95/08348 và WO 96/29094; và Chu *et al.*, 1983, *Infect. Immunity* 40:245-256.

Các kỹ thuật thích hợp khác sử dụng carbodiimit, hydrazua, este hoạt tính, norboran, axit p-nitrobenzoic, N-hydroxysuccinimit, S--NHS, EDC, TSTU. Nhiều kỹ thuật được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 98/42721. Quy

trình liên hợp có thể bao gồm tác nhân liên kết carbonyl mà có thể được tạo ra bằng phản ứng của nhóm hydroxyl tự do của sacarit với CDI (xem Bethell *et al.*, 1979, J. Biol. Chem. 254:2572-4; Hearn *et al.*, 1981, J. Chromatogr. 218:509-18) sau đó là phản ứng với protein để tạo ra liên kết carbamat. Quy trình này có thể bao gồm bước khử đầu tận cùng anome thành nhóm hydroxyl bậc một, bước bảo vệ/khử bảo vệ tùy ý nhóm hydroxyl bậc một, bước cho nhóm hydroxyl bậc một này phản ứng với CDI để tạo ra hợp chất trung gian CDI carbamat và bước kết hợp hợp chất trung gian CDI carbamat với nhóm amino trên protein.

Sau khi liên hợp polysacarit nang với protein mang, thì thể liên hợp polysacarit-protein được tinh chế (được làm giàu đối với một lượng thể liên hợp polysacarit-protein) bằng một hoặc nhiều kỹ thuật khác nhau. Các ví dụ về các kỹ thuật này là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình và bao gồm thao tác cô/lọc màng, lọc siêu, kết tủa/rửa giải, sắc ký cột, và lọc theo độ sâu. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,146,902.

Sau khi từng thể liên hợp glyco riêng lẻ được tinh chế, thì chúng được kết hợp để phối trộn chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế. Các thể liên hợp phế cầu khuẩn này được tạo ra bằng các quy trình tách biệt và khối được phối trộn thành từng dạng liều lượng phối trộn đơn lẻ.

Một phương pháp thay thế để đặc trưng hóa các thể liên hợp glyco theo sáng chế là bằng số lượng gốc lysin trong protein mang (ví dụ, CRM197) bắt đầu được liên hợp với sacarit mà có thể được đặc trưng dưới dạng khoảng lysin đã liên hợp (mức độ liên hợp). Bằng chứng về cải biến lysin của protein mang, do các liên kết cộng hóa trị với các polysacarit, có thể thu được bằng phép phân tích axit amin bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Quy trình liên hợp dẫn đến việc làm giảm số lượng gốc lysin được thu hồi, so với vật liệu ban đầu protein mang dùng để tạo ra vật liệu liên hợp. Theo một phương án được ưu tiên, mức độ liên hợp của thể liên hợp glyco theo sáng chế nằm trong khoảng từ 2 đến 15, nằm trong khoảng từ 2 đến 13, nằm trong khoảng từ 2 đến 10, nằm trong khoảng từ 2 đến 8, nằm trong khoảng từ 2 đến 6, nằm trong khoảng từ 2 đến 5, nằm trong khoảng từ 2 đến 4, nằm trong khoảng từ 3

đến 15, nằm trong khoảng từ 3 đến 13, nằm trong khoảng từ 3 đến 10, nằm trong khoảng từ 3 đến 8, nằm trong khoảng từ 3 đến 6, nằm trong khoảng từ 3 đến 5, nằm trong khoảng từ 3 đến 4, nằm trong khoảng từ 5 đến 15, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 8 đến 15, nằm trong khoảng từ 8 đến 12, nằm trong khoảng từ 10 đến 15 hoặc nằm trong khoảng từ 10 đến 12. Theo một phương án, mức độ liên hợp của thể liên hợp glyco theo sáng chế là khoảng 2, khoảng 3, khoảng 4, khoảng 5, khoảng 6, khoảng 7, khoảng 8, khoảng 9, khoảng 10, khoảng 11, khoảng 12, khoảng 13, khoảng 14 hoặc khoảng 15. Theo phương án được ưu tiên, mức độ liên hợp của thể liên hợp glyco theo sáng chế là nằm trong khoảng từ 4 đến 7. Theo một số phương án như vậy, protein mang là CRM197.

Thể liên hợp glyco của chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được đặc trưng bởi tỷ lệ (trọng lượng/trọng lượng) của sacarit với protein mang (Ps:Pr). Theo một số phương án, tỷ lệ của polysacarit với protein mang của thể liên hợp glyco (trọng lượng/trọng lượng) trong chế phẩm này nằm trong khoảng từ 0,5 đến 3,0 (ví dụ, khoảng 0,5, khoảng 0,6, 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, khoảng 2,5, khoảng 2,6, khoảng 2,7, khoảng 2,8, khoảng 2,9, hoặc khoảng 3,0). Theo các phương án khác, tỷ lệ sacarit với protein mang (trọng lượng/trọng lượng) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,5, nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,5, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 2,5, nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,0, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,5, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 2,4, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 2,3, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 2,2, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 2,1, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,9, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,8, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,7, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,6, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,5, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,4, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,3, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 2,4, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 2,3, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 2,2, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 2,1, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,9, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,8, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,7, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,6, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,5, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,4, nằm trong khoảng từ

0,9 đến 1,3, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,2, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 2,4, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 2,3, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 2,2, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 2,1, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,9, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,8, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,7, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,6, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,5, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,4, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,3 hoặc nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,2. Theo các phương án khác, tỷ lệ sacarit với protein mang (trọng lượng/trọng lượng) nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,2. Theo một số phương án như vậy, protein mang là CRM197. Các thể liên hợp glyco và chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể chứa sacarit tự do không được liên hợp đồng hóa trị với protein mang, tuy nhiên có mặt trong chế phẩm liên hợp glyco. Sacarit tự do có thể không được kết hợp cộng hóa trị (tức là, không liên kết cộng hóa trị với, được hấp thụ với, hoặc được bẫy trong hoặc với) thể liên hợp glyco.

Theo một số phương án cụ thể, tỷ lệ sacarit với protein mang (trọng lượng/trọng lượng) đối với thể liên hợp kiểu huyết thanh 15A nằm trong khoảng từ 1,0 đến khoảng 2,0, nằm trong khoảng từ 1,25 đến khoảng 1,75, hoặc nằm trong khoảng từ 1,3 đến khoảng 1,7. Theo các phương án khác, tỷ lệ sacarit với protein mang (trọng lượng/trọng lượng) đối với kiểu huyết thanh 15A là khoảng 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, hoặc 1,8.

Theo một số phương án cụ thể, tỷ lệ sacarit với protein mang (trọng lượng/trọng lượng) đối với thể liên hợp kiểu huyết thanh 15C là nằm trong khoảng từ 1,0 đến khoảng 2,0, nằm trong khoảng từ 1,25 đến khoảng 1,75, hoặc nằm trong khoảng từ 1,3 đến khoảng 1,7. Theo các phương án khác, tỷ lệ sacarit với protein mang (trọng lượng/trọng lượng) đối với kiểu huyết thanh 15C là khoảng 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, hoặc 1,8.

Theo một số phương án cụ thể, tỷ lệ sacarit với protein mang (trọng lượng/trọng lượng) đối với thể liên hợp kiểu huyết thanh 33F là nằm trong khoảng từ 1,0 đến khoảng 2,0, nằm trong khoảng từ 1,25 đến khoảng 1,75, hoặc nằm trong khoảng từ 1,3 đến khoảng 1,7. Theo các phương án khác, tỷ lệ sacarit với protein

mang (trọng lượng/trọng lượng) đối với kiểu huyết thanh 33F là khoảng 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, hoặc 1,8.

Theo một số phương án cụ thể, tỷ lệ sacarit với protein mang (trọng lượng/trọng lượng) đối với thể liên hợp kiểu huyết thanh 35B là nằm trong khoảng từ 1,25 đến khoảng 2,25, nằm trong khoảng từ 1,25 đến khoảng 2,0, hoặc nằm trong khoảng từ 1,3 đến khoảng 1,8. Theo các phương án khác, tỷ lệ sacarit với protein mang (trọng lượng/trọng lượng) đối với kiểu huyết thanh 33B là khoảng 1,2, 1,3, 1,3, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, hoặc 2,0.

Theo một số phương án cụ thể, tỷ lệ sacarit với protein mang (trọng lượng/trọng lượng) đối với thể liên hợp kiểu huyết thanh 24F là nằm trong khoảng từ 0,5 đến khoảng 1,5, nằm trong khoảng từ 0,75 đến khoảng 1,25, hoặc nằm trong khoảng từ 0,8 đến khoảng 1,0. Theo các phương án khác, tỷ lệ sacarit với protein mang (trọng lượng/trọng lượng) đối với kiểu huyết thanh 24F là khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, hoặc 1,0.

Theo phương án được ưu tiên, thể liên hợp glyco chứa ít hơn khoảng 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20% hoặc 15% polysacarit tự do so với tổng lượng polysacarit. Theo phương án được ưu tiên, thể liên hợp glyco chứa ít hơn khoảng 25% polysacarit tự do so với tổng lượng polysacarit. Theo phương án được ưu tiên, thể liên hợp glyco chứa ít hơn khoảng 20% polysacarit tự do so với tổng lượng polysacarit. Theo phương án được ưu tiên, thể liên hợp glyco chứa ít hơn khoảng 15% polysacarit tự do so với tổng lượng polysacarit.

IV. Phương pháp sử dụng

Các phương án theo sáng chế còn bao gồm một hoặc nhiều chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được mô tả ở đây (i) để sử dụng trong, (ii) để sử dụng làm thuốc hoặc chế phẩm cho, hoặc (iii) để sử dụng trong bào chế thuốc cho: (a) liệu pháp (ví dụ, ở cơ thể người); (b) thuốc; (c) ức chế sự lây nhiễm *Streptococcus pneumoniae*; (d) cảm ứng đáp ứng miễn dịch hoặc đáp ứng miễn dịch bảo vệ kháng *S. pneumoniae*; (e) phòng ngừa lây nhiễm *S. pneumoniae*; (f) ngăn ngừa sự tái lây nhiễm *S. pneumoniae*; (g) làm giảm tiến trình, sự khởi phát hoặc độ nghiêm trọng

của các triệu chứng bệnh lý liên quan đến lây nhiễm *S. pneumoniae* bao gồm ngăn ngừa các biến chứng kết hợp như bại não, mất thị lực, và động kinh, (h) làm giảm khả năng lây nhiễm *S. pneumoniae* hoặc, (i) điều trị, ngăn ngừa, hoặc trì hoãn sự khởi phát, độ nghiêm trọng, hoặc tiến trình của (các) bệnh do phế cầu khuẩn, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: bệnh viêm phổi do phế cầu khuẩn, bệnh nhiễm khuẩn huyết do phế cầu khuẩn, bệnh viêm màng não do phế cầu khuẩn, viêm tai giữa nhiễm trùng và viêm xoang. Khi sử dụng như vậy, chế phẩm liên hợp polysaccharit phế cầu khuẩn đa hóa trị theo sáng chế có thể tùy ý được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất phụ trợ, hoặc không có chất phụ trợ.

Theo đó, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị phòng ngừa (tức là bảo vệ chống lại) lây nhiễm *S. pneumoniae* hoặc bệnh do phế cầu khuẩn bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng một hoặc nhiều chế phẩm liên hợp polysaccharit-protein phế cầu khuẩn sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế.

Chế phẩm và dạng phối trộn theo sáng chế có thể được sử dụng để bảo vệ hoặc điều trị cho người mắc cảm với lây nhiễm, ví dụ, lây nhiễm phế cầu khuẩn, bằng cách dùng chế phẩm theo sáng chế thông qua đường toàn thân hoặc đường niêm mạc.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp cảm ứng đáp ứng miễn dịch với *S. pneumoniae*, bao gồm việc cho bệnh nhân dùng lượng cho tác dụng miễn dịch của chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tiêm chủng cho người để chống lại lây nhiễm phế cầu khuẩn, bao gồm bước cho người này dùng lượng cho tác dụng miễn dịch của chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế.

Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp (1) cảm ứng đáp ứng miễn dịch ở người bệnh, (2) cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở người bệnh, (3) tiêm chủng cho người bệnh để chống lại lây nhiễm *S. pneumoniae*, hoặc (4) làm giảm khả năng lây nhiễm *S. pneumoniae* ở người bệnh, phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế (tức là chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị bất kỳ được mô tả ở đây, như chế

phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được mô tả trong phần II, tiêu đề “chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị”, nêu trên).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa bệnh viêm phổi do phế cầu khuẩn và bệnh xâm lấn ở người trưởng thành 18 tuổi và lớn tuổi hơn. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa bệnh viêm phổi do phế cầu khuẩn và bệnh xâm lấn gây ra bởi 24 chủng *Streptococcus pneumoniae* (3, 6A, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F, và 35B).

Theo một phương án của các phương pháp ở trên, chế phẩm chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh: 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A. Theo một phương án của các phương pháp ở trên, chế phẩm chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh: 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20. Theo một phương án của các phương pháp ở trên, chế phẩm chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh: 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B. Theo một phương án khác của các phương pháp ở trên, chế phẩm này còn chứa thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* của kiểu huyết thanh 6A hoặc 6C.

Đã cho thấy rằng vacxin liên hợp phế cầu khuẩn chứa kiểu huyết thanh 6A có thể mang lại một số sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 6C (Cooper *et al.*, *Vaccine* 29 (2011) 7207– 7211). Do đó, theo một số phương án của các phương pháp ở trên, sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa

trị không chứa kiểu huyết thanh 6C, nhưng lại chứa kiểu huyết thanh 6A hoặc các kiểu huyết thanh 6A và 6B. Theo các phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch chứa các thể liên hợp phẩy cầu khuẩn của các kiểu huyết thanh 6A, 6B, và 6C. Theo các phương án cụ thể của các phương pháp ở trên, các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm:

I-a) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A;

I-b) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A;

I-c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A; và

I-d) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A.

Theo các phương án cụ thể của tập hợp các kiểu huyết thanh ở trên (I-a đến I-d), kiểu huyết thanh 20 hoặc 20B có thể được thay thế cho kiểu huyết thanh 20A.

Theo các phương án khác của các phương pháp ở trên, các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm:

II-a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B;

II-b) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B;

II-c) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B;

II-d) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B;

II-e) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A;

II-f) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A;

II-g) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A; và

II-h) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A.

Theo các phương án cụ thể của tập hợp các kiểu huyết thanh ở trên (II-e đến IIh), kiểu huyết thanh 20 hoặc 20B có thể được thay thế cho kiểu huyết thanh 20A.

Theo các phương án khác của các phương pháp ở trên, các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh như nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án I-a), II-a) hoặc II-e) và còn bao gồm các kiểu huyết thanh 6A, 6B, và 6C.

Cũng đã cho thấy rằng vacxin liên hợp phế cầu khuẩn chứa kiểu huyết thanh 10A có thể mang lại một số sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 39 (xem WO 2017/ 085586). Do đó, theo một số phương án của các phương pháp ở trên, sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị không chứa kiểu huyết thanh 10A, mà chứa kiểu huyết thanh 39. Theo các phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch chứa các thể liên hợp phế cầu khuẩn của các kiểu huyết thanh 10A và 39. Theo các phương án cụ thể của các phương pháp ở trên, các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm:

III-a) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A;

III-b) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A;

III-c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A;

III-d) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A;

III-e) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A;

III-f) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A;

III-g) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A; và

III-h) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A.

Theo các phương án cụ thể của tập hợp các kiểu huyết thanh ở trên (II-a đến III-h), kiểu huyết thanh 20 hoặc 20B có thể được thay thế cho kiểu huyết thanh 20A.

Theo các phương án khác của các phương pháp ở trên, các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh như nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án từ III-a) đến III-h) và còn bao gồm kiểu huyết thanh 10A.

Cũng đã cho thấy rằng các thể liên hợp sinh miễn dịch chứa polysacarit nang *S. pneumoniae* kiểu huyết thanh 15B được liên kết cộng hóa trị với protein mang có thể mang lại một số sự bảo vệ chéo kháng kiểu huyết thanh 15C và/hoặc kiểu huyết thanh 15A (xem WO 2015/110942). Do đó, theo một số phương án của các phương pháp ở trên, sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị không chứa kiểu huyết thanh 15C (hoặc 15B được khử O-axetyl), mà chứa kiểu huyết thanh 15B (tức là polysacarit kiểu huyết thanh 15B không được khử O-axetyl). Theo các phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch chứa các thể liên hợp phẩy cầu khuẩn của các kiểu huyết thanh 15B và 15C (hoặc 15B được khử O-axetyl). Theo các phương án cụ thể của các phương pháp ở trên, các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm:

IV-a) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20A;

IV-b) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20A;

IV-c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20A;

IV-d) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20A;

IV-e) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20A;

IV-f) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20A;

IV-g) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20A; và

IV-h) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20A.

Theo các phương án cụ thể của tập hợp các kiểu huyết thanh ở trên (IVa đến IVh), kiểu huyết thanh 20 hoặc 20B có thể được thay thế cho kiểu huyết thanh 20A.

Theo các phương án khác của các phương pháp ở trên, các kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* bao gồm tập hợp các kiểu huyết thanh như nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án từ IV-a) đến IV-h) và còn bao gồm kiểu huyết thanh 15C (và/hoặc 15B được khử O-axetyl).

Chế phẩm theo sáng chế hữu ích trong các phương pháp mang lại sự bảo vệ bổ sung chống lại *S. pneumoniae* ở các bệnh nhân đã nhận vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị từ trước đó. Khi sử dụng như vậy, chế phẩm theo sáng chế có thể mang lại sự bảo vệ chống lại các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể mà bệnh nhân chưa được tiêm chủng chống lại kiểu huyết thanh này trước đó, có thể mang lại sự bảo vệ bổ sung chống lại các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* mà bệnh nhân đã được tiêm chủng chống lại các kiểu huyết thanh này từ trước đó, hoặc có thể mang lại sự bảo vệ chống lại cả hai kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* mà bệnh nhân chưa được tiêm chủng chống lại các kiểu huyết thanh này từ trước đó và các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* mà bệnh nhân đã được tiêm chủng chống lại các kiểu huyết thanh này từ trước đó.

Vì vậy, sáng chế đề cập đến phương pháp cảm ứng đáp ứng miễn dịch, tiêm chủng, hoặc cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại *S. pneumoniae* ở bệnh nhân, bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị, chế phẩm chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, trong đó các thể liên hợp polysacarit protein chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó bệnh nhân này đã được tiêm

chủng từ trước chống lại *S. pneumoniae*. Theo các phương án của khía cạnh này của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị có thể là chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị bất kỳ được mô tả ở đây. Theo các phương án cụ thể của phương pháp theo sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được dùng cho bệnh nhân được điều trị từ trước bằng vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị. Vaccin sinh miễn dịch đa hóa trị có thể là vaccin bất kỳ được chỉ định để ngăn ngừa bệnh do phế cầu khuẩn gây ra bởi nhiều hơn một kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae*.

Theo một số phương án cụ thể của phương pháp ở trên, bệnh nhân được điều trị từ trước bằng vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị mà được chỉ định để ngăn ngừa bệnh do phế cầu khuẩn gây ra bởi các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm bao gồm:

- a) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F và 23F;
- b) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, và 19A;
- c) 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F và 23F;
- d) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, và 33F;
- e) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20; và
- f) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 10A, 11A, 12F và 15B.

Theo một số phương án cụ thể của phương pháp ở trên, vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa polysaccharit nang của các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20A. Theo một số phương án cụ thể của phương pháp ở trên, vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa polysaccharit nang của các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20. Theo một số phương án cụ thể của phương pháp ở trên, vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa polysaccharit nang của các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20B.

Theo một số phương án cụ thể của phương pháp ở trên, vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein, trong đó các thể liên hợp polysacarit protein này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang. Theo các phương án khác, vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa nhiều polysacarit nang *S. pneumoniae* không được liên hợp với protein mang.

Theo các phương án bổ sung của phương pháp ở trên, bệnh nhân được điều trị từ trước bằng PREVNAR® 13 (vaccin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 13 [protein CRM197 bạch hầu], Pfizer, Inc., Philadelphia, PA, USA).

Theo các phương án khác của phương pháp ở trên, bệnh nhân được điều trị từ trước bằng PNEUMOVAX® 23 (vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA).

Theo các phương án khác nữa của phương pháp ở trên, bệnh nhân được điều trị từ trước bằng SYNFLORIX™ (vaccin liên hợp polysacarit phế cầu khuẩn (hấp phụ), GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rixensart, Bỉ).

Theo các phương án của phương pháp ở trên, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế được dùng cho bệnh nhân ở thời điểm bất kỳ sau khi bệnh nhân này nhận vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị, theo chế độ điều trị được cung cấp bởi chuyên gia y khoa, ví dụ, bác sĩ. Theo các phương án cụ thể, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế được dùng cho bệnh nhân trong thời gian từ 1 tháng đến 5 năm sau khi bệnh nhân nhận vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị, theo một cách khác, từ 1 tháng đến 1 năm, từ 1 tháng đến 2 năm, từ 1 tháng đến 3 năm, từ 1 tháng đến 4 năm, từ 1 tháng đến 6 tháng, từ 2 tháng đến 6 tháng, từ 2 tháng đến 1 năm, từ 1 năm đến 5 năm, từ 6 tháng đến 5 năm, từ 6 tháng đến 4 năm, từ 6 tháng đến 3 năm, từ 6 tháng đến 2 năm, từ 6 tháng đến 1 năm, từ 1 năm đến 4 năm, từ 1 năm đến 3 năm, hoặc từ 1 năm đến 2 năm, sau khi bệnh nhân nhận vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị. Theo các phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được dùng cho bệnh nhân khoảng 1 tháng, khoảng 2 tháng, khoảng 3 tháng, khoảng 4 tháng, khoảng 5 tháng, khoảng 6 tháng, khoảng 7 tháng, khoảng 8 tháng, khoảng 9

tháng, khoảng 10 tháng, khoảng 11 tháng, khoảng 1 năm, khoảng 1,25 năm, khoảng 1,5 năm, khoảng 1,75 năm, khoảng 2 năm, khoảng 2,25 năm, khoảng 2,5 năm, khoảng 2,75 năm, khoảng 3 năm, khoảng 3,25 năm, khoảng 3,5 năm, khoảng 3,75 năm, khoảng 4 năm, khoảng 4,25 năm, khoảng 4,5 năm, khoảng 4,75 năm, hoặc khoảng 5 năm sau khi bệnh nhân nhận vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp (1) cảm ứng đáp ứng miễn dịch ở người bệnh, (2) cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở người bệnh, (3) tiêm chủng người bệnh chống lại lây nhiễm *S. pneumoniae*, hoặc (4) làm giảm khả năng lây nhiễm *S. pneumoniae* ở người bệnh, phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế và dùng vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị, theo trình tự bất kỳ. Vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị có thể là vaccin bất kỳ được chỉ định để ngăn ngừa bệnh do phế cầu khuẩn gây ra bởi nhiều hơn một kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae*.

Theo một số phương án cụ thể của phương pháp ở trên, bệnh nhân được điều trị bằng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế và vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị mà được chỉ định để ngăn ngừa bệnh do phế cầu khuẩn gây ra bởi các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm bao gồm:

- a) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F và 23F;
- b) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, và 19A;
- c) 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F và 23F;
- d) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, và 33F;
- e) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20; và
- f) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 10A, 11A, 12F và 15B.

Theo một số phương án cụ thể của phương pháp ở trên, vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa polysaccharit nang của các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20A.

Theo một số phương án cụ thể của phương pháp ở trên, vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein, trong đó các thể liên hợp polysacarit protein này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang. Theo các phương án khác, vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa nhiều polysacarit nang *S. pneumoniae* không được liên hợp với protein mang.

Theo các phương án bổ sung của phương pháp ở trên, bệnh nhân được điều trị bằng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế và được điều trị bằng PREVNAR® 13 (vaccin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 13 [protein CRM197 bạch hầu], Pfizer, Inc., Philadelphia, PA, USA), theo trình tự bất kỳ. Theo một phương án, trước tiên bệnh nhân được cho dùng PREVNAR® 13 và sau đó bệnh nhân này được dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Theo các phương án thay thế, trước tiên bệnh nhân được cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế và sau đó được cho dùng PREVNAR® 13.

Theo các phương án khác của phương pháp ở trên, bệnh nhân được điều trị bằng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế và được điều trị bằng PNEUMOVAX® 23 (vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA), theo trình tự bất kỳ. Theo một phương án, trước tiên bệnh nhân được cho dùng PNEUMOVAX® 23 và sau đó bệnh nhân này được cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Theo các phương án thay thế, trước tiên bệnh nhân được cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế và sau đó được cho dùng PNEUMOVAX® 23.

Theo các phương án khác nữa của phương pháp ở trên, bệnh nhân được điều trị bằng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế và được điều trị bằng SYNFLORIX™ (vaccin liên hợp polysacarit phế cầu khuẩn (hấp phụ), GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rixensart, Bỉ), theo trình tự bất kỳ. Theo một phương án, trước tiên bệnh nhân được cho dùng SYNFLORIX™ và sau đó bệnh nhân này được cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Theo một phương án thay thế, trước tiên bệnh nhân được cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế và sau đó được cho dùng SYNFLORIX™.

Theo một số phương án của phương pháp ở trên, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị và vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị được dùng đồng thời. Như được sử dụng ở đây, “dùng đồng thời” không bị giới hạn ở việc định liều hai chế phẩm ở cùng thời điểm, mà còn bao gồm việc dùng một chế phẩm ngay sau chế phẩm còn lại theo trình tự bất kỳ. Theo một số phương án, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị và vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị được dùng bằng cách dùng trong cơ hoặc dưới da vào các điểm giải phẫu tách biệt, ví dụ, hai tay khác nhau.

Theo một số phương án của phương pháp ở trên, thời lượng giữa việc dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế và dùng vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị nằm trong khoảng từ 4 tuần đến khoảng 1 năm. Theo các phương án thay thế, thời lượng này nằm trong khoảng từ 1 tháng đến khoảng 5 năm.

Theo một phương án, trước tiên bệnh nhân được cho dùng vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị và sau đó đến chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Theo các phương án thay thế, trước tiên bệnh nhân được cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế và sau đó được cho dùng vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp cảm ứng đáp ứng miễn dịch, tiêm chủng hoặc cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại *S. pneumoniae* ở bệnh nhân, bao gồm các bước:

- (1) cho bệnh nhân này dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị, chế phẩm chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này polysacarit protein chứa polysacarit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang,
- (2) đợi một khoảng thời gian định trước trôi qua, và
- (3) cho bệnh nhân này dùng vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị.

Trong phương pháp này, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị có thể chứa hỗn hợp bất kỳ của các thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* nêu ở đây và vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị có thể là vaccin bất kỳ được chỉ định để ngăn ngừa bệnh gây ra bởi nhiều hơn một kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae*.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp cảm ứng đáp ứng miễn dịch, tiêm chủng hoặc cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại *S. pneumoniae* ở bệnh nhân, bao gồm các bước:

- (1) cho bệnh nhân này dùng vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị,
- (2) đợi một khoảng thời gian định trước trôi qua, và
- (3) cho bệnh nhân này dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị, chế phẩm này chứa nhiều thể liên hợp polysaccharit protein *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này polysaccharit protein chứa polysaccharit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang.

Trong phương pháp này, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị có thể chứa hỗn hợp bất kỳ của các thể liên hợp polysaccharit protein *S. pneumoniae* nêu ở đây và vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị có thể là vaccin bất kỳ được chỉ định để ngăn ngừa bệnh gây ra bởi nhiều hơn một kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae*.

Theo một số phương án của các phương pháp ở trên, vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysaccharit protein *S. pneumoniae*, trong đó các thể liên hợp polysaccharit protein chứa polysaccharit nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang. Theo các phương án thay thế, vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa polysaccharit nang *S. pneumoniae* không được liên hợp với protein mang.

Theo các phương án bất kỳ của phương pháp theo sáng chế (tức là bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả ở đây), phương pháp này có thể còn bao gồm bước cho bệnh nhân dùng một hoặc nhiều liều bổ sung của chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Trong các phương pháp này, bệnh nhân có thể đã nhận vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị trước khi nhận liều thứ nhất của chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế, nêu trên, hoặc có thể chưa được tiêm chủng chống lại *S. pneumoniae* trước khi nhận chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Vì vậy, theo một phương án, bệnh nhân đã nhận vaccin phế cầu khuẩn đa hóa trị được chỉ định để ngăn ngừa bệnh do phế cầu khuẩn gây ra bởi *S. pneumoniae* được dùng hai hoặc nhiều hơn hai liều chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Theo các phương án thay thế, bệnh nhân chưa được điều trị từ trước bằng

vacxin bất kỳ được chỉ định để ngăn ngừa bệnh do phế cầu khuẩn, được dùng hai hoặc nhiều hơn hai liều chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế.

Theo các phương án của phương pháp ở trên, hai hoặc nhiều hơn hai liều là của cùng một chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Theo các phương án thay thế, hai hoặc nhiều hơn hai liều là của các chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị khác nhau theo sáng chế.

Theo một số phương án cụ thể của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, bệnh nhân được cho dùng hai, ba, hoặc bốn liều chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Theo các phương án cụ thể, bệnh nhân thiếu sức đề kháng (ví dụ, trên chế độ ức chế miễn dịch sau khi ghép tế bào thân) và số lượng liều là ba.

Theo một số phương án, thời lượng giữa việc dùng mỗi liều chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế nằm trong khoảng từ 4 tuần đến khoảng 1 năm. Theo một phương án thay thế, thời lượng giữa việc dùng mỗi liều chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế nằm trong khoảng từ 1 tháng đến khoảng 5 năm.

Theo các phương án của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế, bệnh nhân cần được điều trị bằng (các) chế phẩm theo sáng chế là người. Theo một số phương án, người bệnh là trẻ mới biết đi (khoảng từ 12 đến 24 tháng), hoặc trẻ nhỏ (khoảng từ 2 đến 5 năm). Chế phẩm theo sáng chế này cũng thích hợp để sử dụng cho trẻ em lớn hơn, thiếu niên và người trưởng thành (ví dụ, tuổi từ 18 đến 45, tuổi từ 18 đến 50, tuổi từ 18 đến 55, tuổi từ 18 đến 60 hoặc tuổi từ 18 đến 65). Theo các phương án khác của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế, bệnh nhân là từ khoảng 2 đến khoảng 18 tuổi. Theo các phương án khác của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế, bệnh nhân 18 tuổi hoặc lớn tuổi hơn.

Theo các phương án khác của phương pháp theo sáng chế, người bệnh là người già. Theo một số phương án của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế, bệnh nhân 50 tuổi hoặc lớn tuổi hơn. Theo một số phương án của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế, bệnh nhân 55 tuổi hoặc lớn tuổi hơn. Theo một số phương án của phương pháp bất kỳ trong số các

phương pháp theo sáng chế, bệnh nhân 60 tuổi hoặc lớn tuổi hơn. Theo các phương án khác nữa của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế, bệnh nhân 65 tuổi hoặc lớn tuổi hơn. Theo các phương án bổ sung của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế, bệnh nhân 70 tuổi hoặc lớn tuổi hơn.

Theo một số phương án của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế, bệnh nhân cần được điều trị bằng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế thiếu sức đề kháng.

Theo một số phương án của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được dùng đồng thời với vaccin chống bệnh cúm. Theo một số phương án, vaccin cúm là “vaccin cúm bậc cao”, một vaccin cúm liều cao được chỉ định cho người già, ví dụ, người 65 tuổi và lớn tuổi hơn.

Sáng chế đề cập đến phương pháp cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở bệnh nhân chống lại lây nhiễm phế cầu khuẩn bao gồm bước cho bệnh nhân dùng lượng cho tác dụng miễn dịch của chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm liên hợp polysaccharit-protein phế cầu khuẩn sinh miễn dịch đa hóa trị được mô tả ở đây. Lượng tối ưu của các thành phần cho vaccin cụ thể (tức là chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị) có thể được xác định bởi các nghiên cứu tiêu chuẩn bao gồm việc quan sát các đáp ứng miễn dịch thích hợp ở các đối tượng. Ví dụ, theo một phương án khác, liều lượng tiêm chủng cho người được xác định bằng cách ngoại suy từ các nghiên cứu trên động vật sang dữ liệu người. Theo một phương án khác, liều lượng được xác định theo kinh nghiệm.

Phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng nguyên phát gây ra bởi vi khuẩn, ví dụ, *S. pneumonia*, bao gồm cả các lây nhiễm xâm lấn (viêm màng não, viêm phổi, và vãng khuẩn huyết), và lây nhiễm không xâm lấn (viêm tai giữa cấp tính, và viêm xoang).

Việc dùng chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều phương pháp trong số: tiêm qua đường trong cơ, trong bụng, trong da hoặc dưới da; hoặc thông qua đường dùng niêm mạc đến đường miệng/ống tiêu hóa, đường hô hấp hoặc

đường sinh dục. Theo một phương án, việc dùng trong mũi được sử dụng để điều trị bệnh viêm phổi hoặc viêm tai giữa (dưới dạng mang phế cầu khuẩn trong mũi-họng có thể được ngăn ngừa hiệu quả hơn, từ đó làm giảm lây nhiễm ở giai đoạn sớm nhất của bệnh). Theo một số phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế được dùng cho bệnh nhân thông qua việc dùng trong cơ hoặc dưới da.

Tất cả các công bố đơn được đề cập ở đây được kết hợp bằng cách viện dẫn nhằm mục đích mô tả và bộc lộ các phương pháp và vật liệu có thể được sử dụng theo sáng chế.

Nhờ các phương án khác nhau của sáng chế được mô tả ở đây dựa trên các hình vẽ đi kèm, nên hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các phương án chính xác đó, và các thay đổi và cải biến đa dạng có thể có hiệu quả nhờ người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này mà không vượt ra khỏi phạm vi hoặc ý tưởng của sáng chế như được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây minh họa, nhưng không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Tạo ra polysaccharit nang *S. pneumoniae*

Các phương pháp nuôi cấy phế cầu khuẩn đã biết rõ trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Chase, 1967, *Methods of Immunology and Immunochemistry* 1:52. Các phương pháp tạo ra các polysaccharit nang phế cầu khuẩn cũng đã biết rõ trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, patent Châu Âu số EP 0 497 524 B1. Quy trình được mô tả dưới đây thường tuân theo phương pháp được mô tả trong patent Châu Âu số EP 0 497 524 B1 và thường áp dụng được vào tất cả các kiểu huyết thanh phế cầu khuẩn.

Các dạng phân lập của các chủng phế cầu khuẩn đối với các kiểu huyết thanh 6C, 23B, và 31 thu được từ Trung tâm kiểm soát và ngăn ngừa bệnh tật (Atlanta, GA). Các chủng đối với các kiểu huyết thanh 3, 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F, và 33F

thu được từ Đại học Pennsylvania (Dr. Robert Áo). Các chủng đối với các kiểu huyết thanh 17F và 19A thu được từ Cơ quan sinh học FDA (FDA Office of Biologics) (Dr. John Robbins). Kiểu huyết thanh 7F thu được từ Đại học bang New York, Downstate Medical Center (Dr. Gerald Schiffman). Các dạng phân lập của các kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn không được liệt kê ở trên thu được từ Bộ sưu tập giống chuẩn Mỹ (Manassas, VA). Khi cần, thì các kiểu phụ được biệt hóa trên cơ sở phản ứng Quellung bằng cách sử dụng kháng huyết thanh đặc hiệu. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,847,112. Các dạng phân lập thu được được phân lập vô tính thêm nữa bằng cách dàn trên đĩa theo dãy trong hai giai đoạn trên các đĩa thạch gồm có môi trường không có thành phần động vật chứa pepton đậu tương, dịch chiết nấm men, và glucoza không có hemin. Đối với kiểu huyết thanh 7F, các đĩa thạch được dùng cũng chứa hemin. Các dạng phân lập vô tính đối với mỗi kiểu huyết thanh được mở rộng thêm trong môi trường nuôi cấy lỏng bằng cách sử dụng môi trường không chứa thành phần động vật chứa pepton đậu tương, dịch chiết nấm men, HEPES, natri clorua, natri bicarbonat, kali phosphat, glucoza, và glyxerol để tạo ra các ngân hàng tế bào tiền cơ bản.

Quy trình sản xuất mỗi kiểu huyết thanh của polysaccharit phẩy cầu khuẩn bao gồm bước mở rộng tế bào và lên men mẻ sản xuất sau đó là bất hoạt hóa học trước khi tinh chế xuôi dòng. Lọ chứa ngân hàng tế bào đã rã đông từ mỗi kiểu huyết thanh được mở rộng bằng cách sử dụng bình lắc hoặc chai nuôi cấy chứa môi trường sinh trưởng không chứa thành phần động vật vô trùng từ trước chứa pepton đậu tương hoặc dịch pepton đậu tương lọc siêu, dịch chiết nấm men hoặc dịch chiết nấm men lọc siêu, HEPES, natri clorua, natri bicarbonat, kali phosphat, và glucoza. Môi trường mở rộng tế bào được cho phát triển trong bình lắc hoặc chai lắc bịt kín để giảm thiểu tối đa sự trao đổi khí với nhiệt độ và kiểm soát khuấy. Đối với các kiểu huyết thanh 3, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 19A, 20, 22F, và 33F, lọ chứa ngân hàng tế bào đã rã đông được mở rộng bằng cách sử dụng thùng lên men chứa cùng một môi trường. Trong quá trình mở rộng tế bào của các kiểu huyết thanh này, nhiệt độ, độ pH, áp suất, và tốc độ khuấy được kiểm soát. Lớp phủ dòng không khí cũng được kiểm soát khi việc sục khí không được sử dụng. Sau khi đạt được mật độ nuôi cấy cụ thể, như được đo bởi mật độ quang ở 600nm, thì một phần của môi

trường mở rộng tế bào được chuyển sang thùng lên men sản xuất chứa môi trường sinh trưởng không chứa thành phần động vật vô trùng từ trước chứa pepton đậu tương hoặc dịch pepton đậu tương lọc siêu, dịch chiết nấm men hoặc dịch chiết nấm men lọc siêu, natri clorua, kali phosphat, và glucoza. Nhiệt độ, độ pH, áp suất, và tốc độ khuấy được kiểm soát. Lớp phủ dòng không khí cũng được kiểm soát khi việc sục khí không được sử dụng.

Bước lên men theo mẻ được kết thúc bằng cách bổ sung chất bất hoạt hóa học, phenol, khi glucoza gần như được rút hết. Phenol tinh khiết được bổ sung vào nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,2% để bất hoạt các tế bào và giải phóng polysacarit nang từ vách tế bào. Bước bất hoạt sơ cấp diễn ra trong một khoảng thời gian cụ thể trong thùng lên men trong đó nhiệt độ và tốc độ khuấy tiếp tục được kiểm soát. Sau khi bất hoạt sơ cấp, mẻ này được chuyển sang một bình khác trong đó nó được giữ trong một khoảng thời gian cụ thể nữa ở nhiệt độ và tốc độ khuấy được kiểm soát để hoàn thành việc bất hoạt. Điều này được xác nhận bằng kỹ thuật dàn trên đĩa vi khuẩn hoặc bằng cách xác nhận nồng độ phenol và thời gian cụ thể. Canh trường đã bất hoạt sau đó được tinh chế.

Ví dụ 2

Tinh chế polysacarit phế cầu khuẩn

Quy trình tinh chế cho các polysacarit phế cầu khuẩn bao gồm một vài bước ly tâm, bước lọc theo độ sâu, các thao tác cô/lọc màng, và bước kết tủa. Tất cả các quy trình được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng trừ khi có quy định cụ thể khác.

Canh trường đã bất hoạt từ môi trường nuôi cấy lên men của *S. pneumoniae* được đóng cục với polyme cation (như BPA-1000, TRETOLITE® (Baker Hughes Inc., Houston, TX), Spectrum 8160, poly(etylenimin), và Millipore pDADMAC). Các polyme cation được liên kết với protein không tinh khiết, axit nucleic và mảnh vụn tế bào. Sau bước đóng cục và giai đoạn hóa già, thì các chất rắn đóng cục được loại bỏ thông qua bước ly tâm và nhiều bước lọc theo độ sâu. Canh trường đã được làm trong được cô và được lọc màng bằng cách sử dụng bộ lọc MWCO từ 100kDa đến 500kDa (cắt giảm phân tử lượng). Bước lọc màng được thực hiện bằng cách sử

dụng Tris, chất đệm $MgCl_2$ và chất đệm natri phosphat. Bước lọc màng loại bỏ axit nucleic và protein còn dư.

Việc loại bỏ các tạp chất khác được thực hiện bằng cách kết tủa lại polysacarit trong natri axetat và phenol với rượu biến tính và/hoặc isopropanol. Trong bước kết tủa phenol, natri axetat trong chất đệm nước muối natri phosphat và phenol (phenol được hóa lỏng hoặc phenol rắn) được nạp vào chất thấm tích đã được lọc màng. Bước phân đoạn rượu của polysacarit sau đó được thực hiện trong hai giai đoạn. Trong giai đoạn thứ nhất, phần trăm rượu thấp được bổ sung vào bước kết tủa để kết tủa mảnh vụn tế bào và các tạp chất không mong muốn khác, trong khi polysacarit thô vẫn còn trong dung dịch. Các tạp chất được loại bỏ thông qua bước ly tâm sau đó là bước lọc theo độ sâu. Sau đó polysacarit được thu hồi từ dung dịch này bằng cách bổ sung thêm isopropanol hoặc rượu biến tính vào mẻ. Viên polysacarit kết tủa được thu hồi bằng cách ly tâm, được nghiền nhỏ và được làm khô dưới dạng bột và được bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ $-70^{\circ}C$.

Ví dụ 3

Phân tích tính đồng nhất cấu trúc của một số kiểu huyết thanh phế cầu khuẩn bằng thử nghiệm NMR

Các mẫu để phân tích NMR được chuẩn bị bằng cách hòa tan bột polysacarit ở 5mg bột/mL dung dịch trong đơteri oxit (D_2O) chứa dimetyl sulfoxit (DMSO) 0,01% và muối 2,2-Dimetyl-2-silapentan-5-sulfonat- d_6 natri 0,01% (DSS- d_6). DMSO là chất nội chuẩn được sử dụng cho phân tích định lượng và DSS- d_6 được sử dụng để thiết lập thang dịch chuyển hóa học đến 0ppm. Thu được tập dữ liệu NMR proton một chiều ở nhiệt độ $50^{\circ}C$ và một phần của phổ chứa các cộng hưởng anome như sau đó được viết một cách chọn lọc dưới dạng tọa độ x, y đối với tệp ASCII để phân tích bằng cách sử dụng tệp làm việc Microsoft Excel. Tọa độ Y (tức là, biên độ phổ) sau đó được so sánh với biên độ phổ của các polysacarit nang vi khuẩn trong cơ sở dữ liệu tham chiếu. Các biên độ tham chiếu được tạo ra theo cách tương tự trên các chế phẩm đã chọn của mỗi kiểu huyết thanh sau đây được ký hiệu dưới dạng lô tham chiếu. Việc so sánh từng cặp được thực hiện với các giá trị y từ mẫu

và phổ tham chiếu để tạo ra hệ số tương quan ($\rho_{x,y}$) làm số đo mức độ tương tự giữa các phổ. Giá trị $\rho \geq 0,95$ với phổ bất kỳ trong số các phổ tham chiếu được chọn làm định danh dương của cấu trúc polysacarit.

Fig.1-Fig.4 cung cấp phổ ^1H NMR 600 MHz một chiều của polysacarit nang lần lượt từ kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 6C, 15A, 15B được khử O-axetyl và 35B. Các vùng đồng nhất ^1H NMR dùng để định danh kiểu huyết thanh của kiểu huyết thanh *S. pneumonia* 6C, 15A, 15B được khử O-axetyl và 35B lần lượt được nêu trên Fig.5-Fig.8.

Cấu trúc của các polysacarit nang từ kiểu huyết thanh S. pneumonia 15B được khử O-axetyl và 15C

Các nghiên cứu sinh miễn dịch được thực hiện bằng cách sử dụng PCV21 ở thỏ trắng New Zealand (xem ví dụ 43, dưới đây). Trong các nghiên cứu này, polysacarit kiểu huyết thanh 15B được khử O-axetyl được sử dụng trong chế phẩm đa hóa trị thay cho kiểu huyết thanh 15C. Các nghiên cứu NMR được thực hiện để xác nhận rằng polysacarit 15B được khử O-axetyl tương đương với polysacarit kiểu huyết thanh 15C.

Sự khác biệt cấu trúc giữa các kiểu huyết thanh của polysacarit nang xuất hiện dưới dạng khác biệt dịch chuyển hóa học trong phổ NMR. Vùng anome (khoảng từ 4,4 ppm đến 6,0 ppm) nhạy với mọi đặc điểm cấu trúc trong đơn vị lặp của polysacarit. Các khác biệt trong hóa học lập thể, chế phẩm monosacarit, O-axetyl hóa và liên kết glycosidic truyền các dịch chuyển hóa học của tín hiệu anome rời vùng này của phổ độc nhất đến mỗi kiểu huyết thanh. Đối với polysacarit kiểu huyết thanh 15B được khử O-axetyl, phổ ^1H NMR tuyệt đối đồng nhất với phổ ^1H NMR của polysacarit kiểu huyết thanh 15C, chỉ ra đơn vị lặp của cả hai polysacarit gồm có các phần tử thể monosacarit và điểm liên kết glycosidic giống nhau (xem Fig.9B-Fig.9C và Fig.10B-Fig.10C). Cũng được thể hiện một cách rõ ràng rằng bước khử O-axetyl loại bỏ nhóm O-axetat có mặt trong polysacarit 15B, và hầu như không có nhóm O-axetat quan sát thấy nào còn lại (xem Fig.10A đến Fig.10F).

Ví dụ 4

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 3 cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong dimethylsulfoxit (DMSO). Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 380 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,25mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 12 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 2mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 10% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 1,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,3. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1,6 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thấm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 1. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 3 đối với nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
186/253 kD	862/1468 kD	1,16	8,2	<1%	<1%

Ví dụ 5

Tạo ra kiểu huyết thanh 6C cho nghiên cứu liên hợp hóa trị một bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Oxy hóa polysacarit

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã lọc đã hòa tan được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,10mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 2,2g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,4. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 15 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 2. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 6C đối với nghiên cứu hóa trị một từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
144/229 kD	2038/4182 kD	1,20	9,2	3,1%	5,8%

Ví dụ 6

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 6C cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã

hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Oxy hóa polysacarit

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã lọc đã hòa tan được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,10mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 1,9g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,4. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 15 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 3. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 6C đối với nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol)	Ps tự do/tổng	Protein tự do/tổng
---------------------	--------------------	-------	--------------------------	---------------	--------------------

			CRM197)	Ps	protein
144/229 kD	2104/5006 kD	1,11	8,4	4,9%	2,2%

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 6A cho nghiên cứu hóa trị một bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cắt chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 200 bar/5 cắt chuyển. Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,10 mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 1,5g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,4. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 15 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

--

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 3a. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 6A cho nghiên cứu hóa trị một từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
238/278 kD	2565/6310 kD	1,021	9,2	3%	5%

Ví dụ 7

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 7F cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 150 bar/7 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,24mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 4°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 2,6g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit

với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysaccharit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysaccharit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysaccharit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbate 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbate 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbate 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 4. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 7F đối với nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
76/118 kD	1817/4026 kD	1,55	6,7	<1%	3,2%

Ví dụ 8

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 8 cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 600 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,18mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 4,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Sau khi trộn, phản ứng liên hợp tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C. Natri xyanoborohydrua không được bổ sung vào phản ứng liên hợp này do quan sát thấy rằng việc bổ sung natri xyanoborohydrua có thể dẫn đến sự kết tủa không thay đổi được trong phản ứng liên hợp đối với kiểu huyết thanh 8. Việc bổ natri xyanoborohydrua khỏi phản ứng sẽ tránh gây kết tủa mà không làm ảnh hưởng đáng kể đến các thuộc tính liên hợp.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbate 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thấm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 5. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 8 đối với nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:P _r	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
110/128 kD	1479/2196 kD	1,17	10,3	3,7%	<1%

Ví dụ 9

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 9N cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phé cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối

của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 250 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,16mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 3,25g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol

trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mê này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mê này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 6. các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 9N đối với nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:P r	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
195/226 kD	1407/3134 kD	1,33	10,1	1,9%	<1%

Ví dụ 10

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 10A cho nghiên cứu hóa trị một bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 200 bar/5 cấy chuyển sau đó là 600 bar/5 cấy chuyển để đạt được phân tử khối mục tiêu.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,15mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 5,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 2,0. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thấm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 7. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 10A đối với nghiên cứu hóa trị một từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
76/111 kD	5137/7061 kD	1,13	5,1	<1%	15%

Ví dụ 11

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 10A cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 600 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,16mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 4,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,75. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 8. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 10A cho nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:P r	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
94/130 kD	1540/3000 kD	1,54	7,7	8,5%	<1%

Ví dụ 12

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 11A cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phẩy cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được giảm kích cỡ bằng cách thủy phân axit bằng cách bổ sung axit axetic đến 200mM, ủ ở nhiệt độ 92°C trong 75 phút, sau đó trung hòa bằng cách bổ sung chất đệm kali phosphat lạnh độ pH = 7 đến 400mM.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,13mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa

trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO chứa natri clorua 25mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 3,5g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0

với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 9. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 11A cho nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
63/96 kD	1584/2804 kD	0,89	7,4	2,2%	2,8%

Ví dụ 13

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 12F cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phé cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được giảm kích cỡ bằng cách thủy phân axit bằng cách bổ sung axit axetic đến 200mM, ủ ở nhiệt độ 90°C trong 45 phút, sau đó trung hòa bằng cách bổ sung chất đệm kali phosphat lạnh độ pH = 7 đến 400mM.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,26mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO chứa natri clorua 25mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 3,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mê này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mê này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 10. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 12F đối với nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
54/73 kD	1766/3119 Kd	1,20	9,6	1,3%	1,5%

Ví dụ 14

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 15A cho nghiên cứu hóa trị một bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa

tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cắt chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 200 bar/5 cắt chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 1,75mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 20 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO chứa natri clorua 25mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 6,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 2,0. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 2,5 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mê này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mê này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 11. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 15A đối với nghiên cứu hóa trị một từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
158/200 kD	6949/9235 kD	1,05	9,7	10%	5,0%

Ví dụ 15

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 15A cho nghiên cứu bảo vệ chéo 15A/B/C bằng cách sử dụng liên hợp chứa nước

Polysacarit được hòa tan, được giảm kích cỡ, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Sau đó CRM197 đã tinh chế được liên hợp với polysacarit hoạt hóa bằng cách sử dụng niken clorua trong hỗn hợp phản ứng chứa nước, và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột polysacarit nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 200 bar/5 cấy chuyển để đạt được phân tử khối mục tiêu. Sau đó polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,45mol natri

metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit. Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 20 giờ ở nhiệt độ 22°C. Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C. Đạt được sự hoạt hóa hơn nữa bằng cách điều chỉnh sản phẩm đã lọc siêu đến 22°C và độ pH = 5. Bước hoạt hóa được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM đồng thời nạp 2,0mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 20 giờ ở nhiệt độ 22°C. Sản phẩm hoạt hóa thứ hai được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

Dung dịch polysacarit đã oxy hóa được trộn với nước và kali phosphat 1,5M độ pH = 6,0. Chất đệm pH được chọn lọc để cải thiện tính cân bằng của polysacarit hoạt hóa trong quá trình phản ứng liên hợp. CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc ở 0,2 micron và kết hợp với dung dịch polysacarit được đệm ở tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 0,6. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Nồng độ polysacarit và phosphat lần lượt là 9,75g/L và 100mM. Nồng độ polysacarit được chọn lọc để kiểm soát kích thước của thể liên hợp thu được. Niken clorua được bổ sung đến khoảng 2mM bằng cách sử dụng dung dịch niken clorua 100mM. Natri xyanoborohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung. Việc liên hợp tiếp diễn trong 148 giờ ở nhiệt độ 10°C để tiêu thụ tối đa polysacarit và protein.

Khử bằng natri borohydrua

Sau phản ứng liên hợp, mẻ này được pha loãng đến nồng độ polysacarit bằng khoảng 3,0g/L, được làm lạnh xuống 2-8°C, và được lọc ở 1,2 micron. Mẻ này được

lọc màng dựa trên kali phosphat 100mM, độ pH = 7,0 ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 100kDa. Mẻ, được thu hồi trong chất thấm tích, sau đó được pha loãng đến khoảng 2,0g polysacarit/L và độ pH được điều chỉnh bằng cách bổ sung natri bicarbonat 1,2M, độ pH = 9,4. Natri borohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung. Kali phosphat 1,5M, độ pH = 6,0 được bổ sung sau đó.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên 10mM L-histidin trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa. Polysorbat 20 được bổ sung vào mẻ thấm tích lại đến nồng độ bằng 0,05% (trọng lượng/thể tích) sau đó mẻ này được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron).

Mẻ này được điều chỉnh đến nồng độ polysacarit bằng 1,0g/L với thêm L-histidin 10mM nữa trong chất đệm natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,03% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20. Mẻ này được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 12. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 15A cho nghiên cứu bảo vệ chéo 15A/B/C từ liên hợp chứa nước

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:P r	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
118/154 kDa	465/695 kDa	0,99	4,5	9,6%	<1%

Ví dụ 16

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 15A cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit

hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cắt chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 200 bar/5 cắt chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 1,75mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 20 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO mà được gia nhiệt từ trước đến 34°C. Dung dịch polysacarit được pha với natri clorua đến nồng độ bằng 50mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 5,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 2,0. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 34°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mê này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mê này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 13. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 15A cho nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
214/231 kD	1628/3518 kD	1,57	7,3	17%	7,8%

Ví dụ 17

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 15B cho nghiên cứu bảo vệ chéo 15A/B/C bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 300 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri

metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,20mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 3,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 2,0. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 5 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbát 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung

hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 14. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 15B cho nghiên cứu bảo vệ chéo 15A/B/C từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
203/252 kD	2329/3881 kD	1,67	7,9	3,6%	4,4%

Ví dụ 18

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 15C cho nghiên cứu hóa trị một và nghiên cứu bảo vệ chéo 15A/B/C bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit thu được từ kiểu huyết thanh 15B *Streptococcus pneumoniae* được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được đưa vào thủy phân bazơ nhẹ để giải phóng các nhóm O-acetyl, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc

siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit, thủy phân bazơ và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn kiểu huyết thanh 15B đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 300 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Dung dịch polysacarit được gia nhiệt đến 60°C và chất đệm natri bicarbonat độ pH = 9 được bổ sung vào nồng độ cuối cùng 50mM. Mẻ này được ủ kèm trộn trong 13 giờ ở nhiệt độ 60°C để giải phóng các nhóm O-acetyl. Chất đệm kali phosphat độ pH = 6 được bổ sung vào nồng độ cuối cùng là 136mM để trung hòa độ pH và dung dịch này được làm mát xuống nhiệt độ môi trường. Sau đó dung dịch này được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,20mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 3,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 2,0. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thấm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 15. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 15C cho nghiên cứu hóa trị một và nghiên cứu bảo vệ chéo 15A/B/C từ liên hợp DMSO

O-axetyl/Ps	Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:P _r	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
Không phát hiện được	182/246 kD	1962/4019 kD	1,31	4,8	3,8%	13%

Ví dụ 19

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 15C cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit thu được từ kiểu huyết thanh 15B *Streptococcus pneumoniae* được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được đưa vào thủy phân bazơ nhẹ để giải phóng các nhóm O-axetyl, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit, thủy phân bazơ và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn kiểu huyết thanh 15B đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để

làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 300 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Dung dịch polysacarit được gia nhiệt đến 60°C và chất đệm natri bicarbonat độ pH = 9 được bổ sung vào nồng độ cuối cùng 50mM. Mẻ này được ủ kèm trộn trong 13 giờ ở nhiệt độ 60°C để giải phóng các nhóm O-acetyl. Chất đệm kali phosphat độ pH = 6 được bổ sung vào nồng độ cuối cùng là 136mM để trung hòa độ pH và dung dịch này được làm mát xuống nhiệt độ môi trường. Sau đó dung dịch này được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,20mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 3,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,75. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 8 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mê này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mê này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 16. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 15C cho nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

O-axetyl/Ps	Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
Không phát hiện được	182/246 kD	1540/3230 kD	1,34	6,6	9,2%	5,7%

Ví dụ 20

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 16F cho nghiên cứu hóa trị một bằng cách sử dụng liên hợp chứa nước

Polysacarit được hòa tan, được giảm kích cỡ, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Sau đó CRM197 đã tinh chế được liên hợp với polysacarit hoạt hóa bằng cách sử dụng niken clorua trong hỗn hợp phản ứng chứa nước, và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột polysacarit nang phé cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước, và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 200 bar/5 cấy chuyển sau đó là 500 bar/5 cấy chuyển để đạt được phân tử khối mục tiêu. Sau đó polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri

metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,15mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

Dung dịch polysacarit đã oxy hóa được trộn với nước và kali phosphat 1,5M độ pH = 7,0. Chất đệm pH được chọn lọc để cải thiện tính cân bằng của polysacarit hoạt hóa trong quá trình phản ứng liên hợp. CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc ở 0,2 micron và kết hợp với dung dịch polysacarit được đệm ở tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 0,7. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Nồng độ polysacarit và phosphat lần lượt là 7,5g/L và 100mM. Nồng độ polysacarit được chọn lọc để kiểm soát kích thước của thể liên hợp thu được. Sau đó dung dịch này được lọc ở 0,2 micron. Niken clorua được bổ sung đến khoảng 2mM bằng cách sử dụng dung dịch niken clorua 100mM. Natri xyanoborohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung. Việc liên hợp tiếp diễn trong 122 giờ ở nhiệt độ 22°C để tiêu thụ tối đa polysacarit và protein.

Khử bằng natri borohydrua

Sau phản ứng liên hợp, mẻ này được pha loãng đến nồng độ polysacarit bằng khoảng 3,0g/L, được làm lạnh xuống 2-8°C, và được lọc ở 1,2 micron. Mẻ này được lọc màng dựa trên kali phosphat 100mM, độ pH = 7,0 ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 100kDa. Mẻ, được thu hồi trong chất thấm tích, sau đó được pha loãng đến khoảng 2,0g polysacarit/L và độ pH được điều chỉnh bằng cách bổ sung natri bicarbonat 1,2M, độ pH = 9,4. Natri

borohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung. Kali phosphat 1,5M, độ pH = 6,0 được bổ sung sau đó.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên 10mM L-histidin trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa. Polysorbat 20 được bổ sung vào mẻ thẩm tích lại đến nồng độ bằng 0,05% (trọng lượng/thể tích) sau đó mẻ này được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron).

Mẻ này được điều chỉnh đến nồng độ polysacarit bằng 1,0g/L với thêm L-histidin 10mM nữa trong chất đệm natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,03% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20. Mẻ này được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 17. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 16F đối với nghiên cứu hóa trị một từ liên hợp chứa nước

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
90/139 kD	1860/5539 kD	1,10	3,3	7,0%	<1%

Ví dụ 21

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 16F cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số

xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cắt chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 1000 bar/5 cắt chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,15mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Dung dịch polysacarit được pha với natri clorua đến nồng độ bằng 50mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 2,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phân phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 18. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 16F đối với nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
91/177 kD	2075/3966 kD	1,29	11,0	<1%	<1%

Ví dụ 22

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 17F cho nghiên cứu hóa trị một bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phé cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 200 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri

metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,11mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Dung dịch polysacarit được pha với natri clorua đến nồng độ bằng 50mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 2,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat

20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phân phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 19. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 17F đối với nghiên cứu hóa trị một từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
179/216 kD	2630/4632 kD	1,20	8,0	1,9%	4,5%

Ví dụ 23

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 17F cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số

xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cắt chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 200 bar/5 cắt chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,11mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Dung dịch polysacarit được pha với natri clorua đến nồng độ bằng 20mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 2,1g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 20. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 17F đối với nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy	Thể liên hợp	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin	Ps tự	Protein tự
-----------	--------------	-------	----------------	-------	------------

hóa Mn/Mw	Mn/Mw		(mol/mol CRM197)	do/tổng Ps	do/tổng protein
150/212 kD	2650/4110 kD	1,10	7,7	2,8%	1,5%

Ví dụ 24

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 19A cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Oxy hóa polysacarit

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Lượng natri metaperiodat được bổ sung là 0,26mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 20 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 3,8g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,33. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 1,5 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 21. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 19A cho nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
96/186 kD	1714/3585 kD	1,22	9,1	7,0%	1,4%

Ví dụ 25

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 20A cho nghiên cứu hóa trị một bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được xác định từ trước là kiểu huyết thanh 20A (Calix *et al.*, Biochemical, Genetic, and Serological Characterization of Two Capsule Subtypes among *Streptococcus pneumoniae* Serotype 20 Strains, *J. Biol. Chem.* 287(33): 27885–27894, (2012)) được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 200 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung ở 0,11mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 2,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit

với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysaccharit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysaccharit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 6 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysaccharit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mê này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mê này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 22. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 20A đối với nghiên cứu hóa trị một từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
165/215 kD	5159/7778 kD	1,17	6,1	<1%	6,5%

Ví dụ 26

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 20A cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phẩy cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cắt chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 220 bar/5 cắt chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung ở 0,16mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Dung dịch polysacarit được pha với natri clorua đến nồng độ bằng 20mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 1,4g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mê này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mê này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thấm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 23. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 20A cho nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
178/215 kD	2478/3863 kD	1,10	8,3	1,0%	1,0%

Ví dụ 27

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 22F cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 400 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung ở 0,12mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 1,8g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 24. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 22F đối với nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
170/196 kD	1800/3970 kD	1,13	7,0	<1%	1,1%

Ví dụ 28

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 23A cho nghiên cứu hóa trị một bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được

kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được giảm kích cỡ bằng cách thủy phân axit bằng cách bổ sung axit axetic đến 200mM, ủ ở nhiệt độ 90°C trong 1,5 giờ, sau đó trung hòa bằng cách bổ sung chất đệm kali phosphat lạnh độ pH = 7 đến 400mM.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung là 0,20mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Dung dịch polysacarit được pha với natri clorua đến nồng độ bằng 50mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 3,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung và việc liên hợp tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 25. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 23A đối với nghiên cứu hóa trị một từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
70/97 kD	2183/3837 kD	1,20	11,8	<1%	<1%

Ví dụ 29

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 23A cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được giảm kích cỡ bằng cách thủy phân axit bằng cách bổ sung axit axetic đến 200mM, ủ ở nhiệt độ 90°C trong 1,5 giờ, sau đó trung hòa bằng cách bổ sung chất đệm kali phosphat lạnh độ pH = 7 đến 400mM.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung là 0,20mol natri

metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 3,5g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung và việc liên hợp tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mê này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mê này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri

clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phân phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 26. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 23A cho nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
116/175 kD	2156/4933 kD	1,12	6,3	3,3%	2,1%

Ví dụ 30

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 23B cho nghiên cứu hóa trị một bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 400 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung ở 0,10mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ

trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Dung dịch polysacarit được pha với natri clorua đến nồng độ cuối cùng bằng 50mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 5,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mê này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mê này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phân phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 27. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 23B cho nghiên cứu hóa trị một từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
155/179 kD	1322/3299 kD	1,28	6,2	13%	5,1%

Ví dụ 31

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 23B cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cắt chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 400 bar/5 cắt chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung ở 0,13mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 5,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 28. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 23B cho nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
172/197 kD	1076/2514 kD	1,26	7,4	12%	3,2%

Ví dụ 32

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 24F cho nghiên cứu hóa trị một và đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được giảm kích cỡ bằng cách thủy phân axit

bằng cách bổ sung axit axetic đến 200mM, ủ ở nhiệt độ 92°C trong 50 phút, sau đó trung hòa bằng cách bổ sung chất đệm kali phosphat lạnh độ pH = 7 đến 400mM.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung là 0,18mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 2mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 10% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Dung dịch polysacarit được pha với natri clorua đến nồng độ cuối cùng bằng 50mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 1,5g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ

polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1 mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mê này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mê này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phân phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 29. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 24F cho nghiên cứu hóa trị một và đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
56/100 kD	2233/4875 kD	0,94	7,3	4,4%	1,4%

Ví dụ 33

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 31 cho nghiên cứu hóa trị một bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phé cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được giảm kích cỡ bằng cách thủy phân axit bằng cách bổ sung axit axetic đến 200mM, ủ ở nhiệt độ 90°C trong 30 phút, sau đó trung hòa bằng cách bổ sung chất đệm kali phosphat lạnh độ pH = 7 đến 400mM.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung là 0,16mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 4,0g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung và việc liên hợp tiếp diễn trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thấm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 30. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 31 cho nghiên cứu hóa trị một từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
96/119 kD	1818/2999 kD	1,15	9,5	<1%	<1%

Ví dụ 34

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 31 cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cắt chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 400 bar/5 cắt chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung ở 0,12mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Dung dịch polysacarit được pha với natri clorua đến nồng độ cuối cùng bằng 50mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 3,5g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 31. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 31 đối với nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
149/186 kD	2354/5971 kD	1,26	8,9	<1%	1,8%

Ví dụ 35

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 33F cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được

kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Giảm kích cỡ polysacarit và oxy hóa

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được đồng nhất hóa để làm giảm phân tử khối của Ps. Áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển thông qua máy đồng nhất hóa được kiểm soát đến 350 bar/4 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung ở 0,12mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và vật liệu CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 1,8g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,75. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Natri xyanoborohydrua (1mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung, và việc liên hợp tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 32. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 33F đối với nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
186/220 kD	1630/2470 kD	1,28	8,4	1,3%	5,4%

Ví dụ 36

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 35B cho nghiên cứu hóa trị một bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Oxy hóa polysacarit

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung là 0,05mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh và CRM197 được hòa tan lại một cách riêng rẽ trong các thể tích bằng nhau của DMSO chứa natri clorua 25mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 10g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 4,0. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Việc liên hợp tiếp diễn trong 2,5 giờ ở nhiệt độ 22°C. Natri borohydrua (0,025mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung trong hai lần pha trong quá trình ủ liên hợp.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1,5 giờ ở nhiệt độ 22°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbate 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mê này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mê thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 33. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 35B cho nghiên cứu hóa trị một từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
48/82 kD	5494/7385 kD	1,26	4,5	1,8%	11%

Ví dụ 37

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 35B cho nghiên cứu đa hóa trị bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp lọc siêu. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong DMSO. Sau đó polysacarit đã hòa tan lại và dung dịch CRM197 được kết hợp và được liên hợp như được mô tả dưới đây. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp lọc siêu trước khi lọc lần cuối ở 0,2 micron. Một vài tham số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian được kiểm soát để thu được các thể liên hợp có thuộc tính mong muốn.

Oxy hóa polysacarit

Bột Ps nang phế cầu khuẩn đã tinh chế được hòa tan trong nước và được lọc ở 0,45 micron. Polysacarit đã hòa tan được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 22°C và độ pH = 5 bằng chất đệm natri axetat để giảm thiểu tối đa sự giảm kích cỡ polysacarit do hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. Natri metaperiodat được bổ sung là 0,05mol natri metaperiodat trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit để đạt được mức hoạt hóa polysacarit mục tiêu (các mol aldehyt trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit). Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên kali phosphat 10mM, độ pH = 6,4 sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước lọc siêu được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Liên hợp polysacarit với CRM197

CRM197 đã tinh chế, thu được thông qua việc biểu hiện trong *Pseudomonas fluorescens* như được mô tả từ trước (WO 2012/173876 A1), được lọc màng dựa trên phosphat 2mM, chất đệm độ pH = 7,2 bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 5% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6mg Pr/mL với nồng độ sucroza là 1% trọng lượng/thể tích.

Ps đã phối trộn và dung dịch CRM197 được làm khô lạnh một cách riêng rẽ. Ps đã được làm khô lạnh được hòa tan lại trong DMSO chứa natri clorua 50mM. CRM197 đã làm khô lạnh được hòa tan lại trong thể tích bằng thể tích của DMSO. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 5,25g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 3,5. Tỷ lệ khối lượng được chọn lọc để kiểm soát tỷ lệ polysacarit với CRM197 trong thể liên hợp thu được. Việc liên hợp tiếp diễn trong 3 giờ ở nhiệt độ 34°C. Natri borohydrua (0,0375mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung trong ba lần pha trong quá trình ủ liên hợp.

Khử bằng natri borohydrua

Natri borohydrua (2mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung sau phản ứng liên hợp và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 34°C. Mẻ này được pha loãng vào natri clorua 150mM, với khoảng 0,025% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó chất đệm kali phosphat được bổ sung để trung hòa độ pH. Mẻ này được cô và được lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25mM độ pH = 7, bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kD.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên histidin 10mM trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0, với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng lọc siêu dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) sau đó được pha loãng với thêm histidin 10mM nữa trong natri clorua 150mM, độ pH = 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

Bảng 34. Các thuộc tính của thể liên hợp kiểu huyết thanh 35B cho nghiên cứu đa hóa trị từ liên hợp DMSO

Ps đã oxy hóa Mn/Mw	Thể liên hợp Mn/Mw	Ps:Pr	Tiêu thụ lysin (mol/mol CRM197)	Ps tự do/tổng Ps	Protein tự do/tổng protein
48/82 kD	1287/2585 kD	2,1	6,9	7,8%	4,6%

Một số phương pháp liên hợp chứa nước không được mô tả cho tất cả các kiểu huyết thanh trong các ví dụ từ ví dụ 38 đến ví dụ 51. Đối với các phương pháp liên hợp chứa nước không được mô tả ở đây, thì các phương pháp tương tự có thể được tìm thấy trong tài liệu WO2018/156491.

Ví dụ 38

Phối trộn vacxin liên hợp phế cầu khuẩn

Các thể liên hợp polysacarit-protein phẩy cầu khuẩn riêng rẽ được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp hóa học khác nhau như được mô tả trong các ví dụ, nêu trên, được sử dụng để phối trộn vaccine liên hợp phẩy cầu khuẩn hóa trị 1, 7, 8, 14, 15, 16, 21 và 31 được đề cập đến lần lượt là PCV1, PCV7, PCV8, PCV14, PCV15, PCV16, PCV21, và PCV31.

Dạng phối trộn sản phẩm thuốc vaccine PCV1 chứa kiểu huyết thanh 3 được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi protic (chứa nước) hoặc dung môi aprotic (DMSO) và được phối trộn trong L-histidin 20mM độ pH = 5,8, NaCl 150mM và PS-20 0,1% (trọng lượng/thể tích) cho nồng độ cuối cùng mục tiêu là 84µg/mL (trọng lượng/thể tích) polysacarit phẩy cầu khuẩn (PnPs) trong vaccine này.

Dạng phối trộn sản phẩm thuốc vaccine PCV7 chứa các kiểu huyết thanh 3, 8, 9N, 10A, 11A, 15A và 19A, được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi protic (chứa nước) hoặc dung môi aprotic (ví dụ, DMSO) và được phối trộn trong L-histidin 20mM độ pH = 5,8, NaCl 150mM và PS-20 0,1% (trọng lượng/thể tích). Mỗi thể liên hợp polysacarit-protein trong PCV7 được phối trộn ở 12µg/mL (trọng lượng/thể tích) polysacarit phẩy cầu khuẩn (PnPs) cho nồng độ cuối cùng mục tiêu là 84µg/mL PnPs trong vaccine này.

Sản phẩm thuốc vaccine PCV8 chứa các kiểu huyết thanh 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ, DMSO) và được phối trộn trong L-histidin 20mM độ pH = 5,8, NaCl 150mM và PS-20 0,2% (trọng lượng/thể tích). Mỗi thể liên hợp polysacarit-protein trong PCV8 được phối trộn ở 4 µg/mL (trọng lượng/thể tích) polysacarit phẩy cầu khuẩn (PnPs) cho nồng độ cuối cùng mục tiêu là 32 µg/mL PnPs trong vaccine này.

Sản phẩm thuốc vaccine PCV14 chứa các kiểu huyết thanh 3, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F và 33F được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi protic (chứa nước) hoặc dung môi aprotic (ví dụ, DMSO) và được phối trộn trong L-histidin 20mM độ pH = 5,8, NaCl

150mM và PS-20 0,1% (trọng lượng/thể tích). Mỗi thể liên hợp polysacarit-protein trong PCV14 được phối trộn ở 6µg/mL (trọng lượng/thể tích) polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) cho nồng độ cuối cùng mục tiêu là 84µg/mL PnPs trong vaccin.

Sản phẩm thuốc vaccin PCV15 chứa các kiểu huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F được liên hợp trong dung môi protic (chứa nước) và được phối trộn trong L-histidin 20mM độ pH = 5,8, NaCl 150mM và PS-20 0,2% (trọng lượng/thể tích). Mỗi thể liên hợp polysacarit-protein được phối trộn ở 4µg/mL (trọng lượng/thể tích) polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs), ngoại trừ đối với 6B, được phối trộn ở 8µg/mL, cho nồng độ cuối cùng mục tiêu là 64µg/mL PnPs trong vaccin.

Sản phẩm thuốc vaccin PCV16 chứa các kiểu huyết thanh 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31, và 35B, được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ, DMSO) và được phối trộn trong L-histidin 20mM độ pH = 5,8 NaCl 150mM và PS-20 0,2% (trọng lượng/thể tích). Mỗi thể liên hợp polysacarit-protein được phối trộn ở 4µg/mL (trọng lượng/thể tích) hoặc 8µg/mL (trọng lượng/thể tích) polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) cho nồng độ cuối cùng mục tiêu là 64µg/mL hoặc 128µg/mL PnPs trong vaccin.

Sản phẩm thuốc vaccin PCV21 chứa các kiểu huyết thanh 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F và 35B, được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ, DMSO) và được phối trộn trong L-histidin 20mM độ pH = 5,8, NaCl 150mM và nhiều nồng độ khác nhau của PS-20 như được xác định trong mỗi ví dụ. Mỗi thể liên hợp polysacarit-protein được phối trộn ở 4µg/mL (trọng lượng/thể tích) hoặc 8µg/mL (trọng lượng/thể tích) polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) cho nồng độ cuối cùng mục tiêu là 84µg/mL hoặc 168µg/mL PnPs trong vaccin. Trong một số ví dụ, PCV21 được phối trộn với 250µg [Al]/mL dưới dạng nhôm phosphat.

Sản phẩm thuốc vaccin PCV31 chứa các kiểu huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20A,

22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F và 35B được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi protic (chứa nước) hoặc dung môi aprotic (ví dụ, DMSO) và được phối trộn trong L-histidin 20mM độ pH = 5,8, NaCl 150mM và PS-20 0,2%. Mỗi thể liên hợp polysacarit-protein được phối trộn ở 4µg/mL (trọng lượng/thể tích) polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs), ngoại trừ đối với 6B, được phối trộn ở 8µg/mL PnPs, cho nồng độ cuối cùng mục tiêu là 128µg/mL PnPs trong vacxin. Trong một số ví dụ, PCV31 được phối trộn với 250µg [Al]/mL dưới dạng nhôm phosphat.

Các dạng phối trộn sản phẩm thuốc PCV hóa trị một bổ sung được tạo ra bằng cách sử dụng các kiểu huyết thanh 6A, 6B, 6C, 10A, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31 hoặc 35B của thể liên hợp polysacarit-protein phế cầu khuẩn. Các chi tiết bổ sung được mô tả trong các ví dụ cụ thể cho các dạng phối trộn này.

Để bào chế dạng phối trộn sản phẩm thuốc PCV, các thể tích của các thể liên hợp khối cần phải có để có được nồng độ cuối cùng đã được chỉ định (trọng lượng/thể tích) của polysacarit phế cầu khuẩn (còn được đề cập đến là PnPs) được tính dựa trên thể tích mẻ và nồng độ polysacarit khối.

Quy trình phối trộn gồm có bước tạo ra hỗn hợp liên hợp khối ở 1X đến 4X nồng độ cuối cùng của hỗn hợp PnPs trong histidin 10-80mM, PS-20 0,0-0,8% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 150mM, độ pH = 5,8.

Histidin độ pH = 5,8, PS-20 (nếu được sử dụng) và dung dịch natri clorua 150mM được điều chế và được bổ sung vào bình phối trộn. Các thể liên hợp polysacarit-protein phế cầu khuẩn riêng rẽ, được bảo quản đông lạnh, được rã đông ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C và sau đó được bổ sung vào bình phối trộn. Trong quá trình bổ sung thể liên hợp polysacarit-protein vào chất đệm phối trộn (hỗn hợp liên hợp), bình này được trộn để đảm bảo tính đồng nhất bằng cách sử dụng que khuấy từ hoặc cánh khuấy từ. Sau khi tất cả các bổ sung đều được thực hiện và dung dịch được khuấy, thì hỗn hợp liên hợp được cho đi qua bộ lọc vô trùng và được gom trong bình có hoặc không có chất phụ trợ nhôm phosphat. Trong một số trường hợp, bộ

lọc vô trùng được theo dõi với natri clorua 150mM để điều chỉnh về đến nồng độ mục tiêu.

Các dạng phối trộn được làm đầy vào xi lanh dẻo, xi lanh thủy tinh, hoặc lọ.

Ví dụ 39

Đánh giá tính cân bằng của vacxin liên hợp phế cầu khuẩn

Sản phẩm thuốc vacxin liên hợp phế cầu khuẩn PCV16 (128 μ g/mL PnPs) hoặc hai sản phẩm thuốc vacxin liên hợp phế cầu khuẩn PCV21 (84 μ g/mL hoặc 168 μ g/mL PnPs) được làm đầy trong các xi lanh hoặc lọ. Các thể liên hợp polysaccharit protein được tạo ra thông qua phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ, DMSO) và được phối trộn trong L-histidin 20mM, độ pH = 5,8, NaCl 150mM, và PS-20 0,2% (trọng lượng/thể tích). Các sản phẩm thuốc này được đặt ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C trong thời gian lên đến bốn tuần và ở nhiệt độ 4°C trong thời gian lên đến mười hai tuần. Trong một số trường hợp, các xi lanh được đặt trên bộ xoay ngang và được lắc trong thời gian lên đến 18 giờ sau khi bảo quản trong 1 tuần ở nhiệt độ 4°C, 25°C hoặc 37°C. Việc này được thực hiện để kích thích ứng suất vận chuyển và xử lý mà có thể đi kèm với quá trình sản xuất và phân phối sản phẩm thuốc. Để đánh giá tính cân bằng của sản phẩm thuốc PCV16 hoặc PCV21, thì HPSEC UV/MALS/RI được sử dụng. Phương pháp sắc ký hiệu năng cao loại trừ kích cỡ (HPSEC), bằng cách sử dụng hai cột Shodex (803 và 806), kết hợp với nhau theo dãy và phương pháp tán xạ ánh sáng nhiều lớp (MALS) tia cực tím (UV) và phương pháp dò chỉ số khúc xạ (RI) để đo nồng độ và khối lượng mol của các dạng phối trộn sản phẩm thuốc PCV trong quá trình bảo quản. Nồng độ này được tính trong từng khoảng thời gian trên pic và sau đó được kết hợp ở tất cả các khoảng cách để đạt được giá trị nồng độ cuối cùng. Sự tán xạ ánh sáng tỷ lệ với sản phẩm có phân tử khối và nồng độ của chất phân tích. Các khối lượng mol hoặc phân tử lượng ở mỗi khoảng cách được tính từ các tín hiệu của bộ dò. Phân tử khối trung bình trọng số (Mw) hoặc trung bình số (Mn) được tính trên tất cả các khoảng cách đối với pic và được báo cáo dưới dạng phân tử lượng trung bình.

Việc bảo quản có thể dẫn đến việc phá hủy protein và/hoặc hydrat cacbon của vaccin liên hợp. Kháng nguyên hydrat cacbon có liên kết chuỗi chính phosphodiester hoặc các tính không ổn định khác trong đơn vị lặp của polysaccharit có thể dễ bị khử polyme hóa thông qua thủy phân khi bảo quản trong thời gian kéo dài và nhiệt độ. Ngoài ra, protein mang hoặc hydrat cacbon được sử dụng trong vaccin liên hợp có thể dễ bị tích tụ khi bảo quản và các ứng suất vật lý.

Như được thể hiện trên Fig.11, sản phẩm thuốc PCV16 và PCV21 ổn định đến 4 tuần ở nhiệt độ 25°C và 37°C và lên đến 12 tuần ở nhiệt độ 4°C bất kể nồng độ polysaccharit. Hơn nữa, khi khuấy ngang sau ứng suất nhiệt, sản phẩm thuốc PCV16 và PCV21 được cho thấy là ổn định. Việc không hao hụt số lượng kháng nguyên do sự hấp phụ không đặc hiệu vào các cạnh của vật chứa hoặc bình được quan sát trong các ứng suất nhiệt và ứng suất vật lý này. Ngoài ra, không có sự tích tụ sản phẩm thuốc nào được quan sát mà tác động tính chất của nó trên cột (ví dụ, gắn kết không thay đổi với cột hoặc không thể đi vào/thoát ra khỏi các cột phân giải) trong tổng liều ước tính của vaccin (Fig.12).

HPSEC UV/MALS/RI được sử dụng để đo phân tử lượng của thể liên hợp polysaccharit-protein. Nếu thể liên hợp polysaccharit-protein trong sản phẩm thuốc thoái biến hoặc khử polyme hóa, thì sự giảm phân tử lượng sẽ rõ rệt và nếu sự tích tụ sản phẩm thuốc diễn ra, thì sự phân tử lượng sẽ diễn ra. Phép đo này đem lại đặc trưng bổ sung về chất lượng của sản phẩm thuốc vaccin hoặc hợp chất trung gian. Như được thể hiện trên Fig.13, sản phẩm thuốc PCV16 và PCV21 chứa các dược chất mà mỗi dược chất được bào chế bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ, DMSO) ổn định chống lại sự khử polyme hóa hoặc sự thoái biến hóa học của hydrat cacbon và ổn định chống lại sự tích tụ của protein trong dạng phối trộn sản phẩm thuốc. Điều này chỉ ra rằng sản phẩm thuốc PCV16 và PCV21 sử dụng các thể liên hợp polysaccharit protein được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic, như DMSO, ổn định qua các ứng suất nhiệt độ và các ứng suất vật lý gia tăng. Các dạng phối trộn cho thấy tính cân bằng ưu việt về cả số lượng và chất lượng. Dạng phối trộn không mất tổng liều do sự hấp phụ không đặc hiệu vào các cạnh của vật chứa hoặc các bề mặt khác và dạng phối

trộn không thoái biến hoặc tích tụ như được chỉ ra bởi phân tử lượng ổn định của sản phẩm thuốc vaccin (phân tử lượng trung bình trọng số (M_w) và phân tử lượng trung bình số (M_n)).

Ví dụ 40

Ảnh hưởng của hóa học liên hợp đến tính cân bằng của vaccin liên hợp phẩy cầu khuẩn

Các thể liên hợp polysaccharit-protein phẩy cầu khuẩn riêng rẽ được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp hóa học khác nhau như được mô tả trong các ví dụ, nêu trên, được sử dụng để phối trộn vaccin liên hợp phẩy cầu khuẩn hóa trị 15 và 16 được đề cập đến là PCV15 và PCV16 ở 64 $\mu\text{g/mL}$. Sản phẩm thuốc vaccin PCV15 chứa các kiểu huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F, được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi protic (tất cả đều chứa nước) và được phối trộn trong L-histidin 20mM độ pH = 5,8, NaCl 150mM và PS-20 0,2% trọng lượng/thể tích (xem ví dụ 38). Sản phẩm thuốc vaccin PCV16 chứa các kiểu huyết thanh 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31, và 35B, được liên hợp bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ, tất cả ĐỀU LÀ DMSO) và được phối trộn trong L-histidin 20mM, độ pH = 5,8, NaCl 150mM, và PS-20 0,2% (trọng lượng/thể tích) (xem ví dụ 38). Mỗi thể liên hợp polysaccharit-protein được phối trộn ở 4 $\mu\text{g/mL}$ (trọng lượng/thể tích) polysaccharit phẩy cầu khuẩn (PnPs) ngoại trừ đối với 6B trong PCV15, được phối trộn ở 8 $\mu\text{g/mL}$, cho nồng độ cuối cùng là 64 $\mu\text{g/mL}$ PnPs trong mỗi vaccin.

Các vật chứa được làm đầy vaccin được đặt ở nhiệt độ 4°C hoặc 37°C trong thời gian lên đến 1 tuần. Quang phổ huỳnh quang protein nội tại (IPFS) được sử dụng để đánh giá tính cân bằng của protein mang được liên hợp polysaccharit phẩy cầu khuẩn, CRM197, trong chế phẩm PCV15 hoặc PCV16 khi bảo quản trong thời gian lên đến 1 tuần ở nhiệt độ 4°C và 37°C. Phổ phát xạ huỳnh quang (Em 290-400 nm) của các mẫu không được pha loãng được gom bằng cách sử dụng máy đo quang phổ kế Jasco FP-6500 ở nhiệt độ môi trường trong phòng trong cu-vét thạch anh chiều

dài đường 1cm. Bước sóng kích thích 280nm được sử dụng với tốc độ quét là 100nm/phút và băng thông kích thích và phát xạ là 3nm.

Như được thể hiện trên Fig.14, dạng phối trộn sản phẩm thuốc chứa các dược chất được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ đều là DMSO) dẫn đến tính cân bằng vật lý và hóa học tốt hơn so với vacxin sử dụng các dược chất được tạo ra bằng cách sử dụng dung môi protic trong phản ứng amin hóa khử trong quy trình liên hợp (tất cả các liên hợp đều chứa nước). Trong khoảng thời gian ngắn là 16 giờ ở nhiệt độ 37°C, cường độ huỳnh quang của sản phẩm thuốc PCV15, ở 64µg/mL PnPs, được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi protic (tất cả đều chứa nước) cho quy trình liên hợp được làm giảm và mức phát xạ lớn nhất của vacxin được chuyển đổi từ 332nm sang 338nm. Sản phẩm thuốc vacxin PCV16, ở 64µg/mL PnPs, sử dụng các dược chất được tạo ra bằng hóa học amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ, tất cả đều là DMSO) không thể hiện sự thay đổi cường độ huỳnh quang hoặc mức phát xạ lớn nhất 338nm. Nên hiểu rằng cường độ tín hiệu thu được và mức phát xạ lớn nhất đạt được từ phép đo IPFS là do tính cân bằng tổng hợp của từng dược chất riêng rẽ trong sản phẩm thuốc phức hợp đa hóa trị. Các tác giả sáng chế cho thấy rằng sản phẩm thuốc vacxin sử dụng tất cả các dược chất được tạo ra trong dung môi aprotic đều ổn định trong khi sản phẩm thuốc vacxin sử dụng tất cả các dược chất được tạo ra trong dung môi protic thì không ổn định.

Không bị hạn chế ở lý thuyết cụ thể bất kỳ, tính cân bằng này có thể là do sự liên hợp trong DMSO dẫn đến việc không gấp và làm biến tính protein mang. Việc liên hợp với protein mang biến tính sẽ chặn cấu dạng ở trạng thái biến tính sau liên hợp. Nếu như vậy, thì nghiên cứu này cũng đề xuất cấu dạng cuối cùng ổn định trong nghiên cứu ứng suất đánh giá ở đây. Do đó, tốt hơn là sử dụng vacxin có thể liên hợp hầu hết được tạo ra với dung môi aprotic để đem lại sản phẩm thuốc vacxin nhất quán và ổn định.

Nếu chế phẩm sản phẩm thuốc vacxin chứa hỗn hợp của các dược chất, thể liên hợp glyco hoặc các thể liên hợp polysacarit protein sử dụng các dung môi amin hóa khử khác nhau (chứa nước hoặc DMSO) trong các quy trình liên hợp, thì trung

bình mức phát xạ lớn nhất hoặc cường độ được đo từ dạng phối trộn sản phẩm thuốc sẽ được tính trọng số do sự đóng góp của mỗi sự phát xạ thể liên hợp polysacarit protein chứa nước ở 332nm và mỗi sự phát xạ thể liên hợp polysacarit protein không chứa nước ở 338nm. Mong đợi rằng sẽ xuất hiện thay đổi, ở cường độ hoặc mức phát xạ lớn nhất, khi nhiệt độ gia tăng đối với hỗn hợp mà không sử dụng tất cả các thể liên hợp polysacarit protein, được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic, trong dạng phối trộn sản phẩm thuốc đa hóa trị. Do đó, tốt hơn là sử dụng vaccin có thể liên hợp hầu hết tạo ra với dung môi aprotic để đem lại sản phẩm thuốc vaccin nhất quán và ổn định.

Ví dụ 41

Các nghiên cứu sinh miễn dịch ở thỏ hóa trị một kết hợp đối với các kiểu huyết thanh chọn lọc

Thỏ trắng trưởng thành New Zealand (NZWR, n=3/nhóm) được tạo miễn dịch trong cơ (IM) bằng 0,25ml hoặc 0,5mL (chỉ đối với 15C) vaccin liên hợp hóa trị một tương ứng vào ngày 0 và ngày 14 (đối bên). Vaccin phẩy cầu khuẩn hóa trị một, được phối trộn trong L-histidin 20mM, độ pH = 5,8, NaCl 150mM, và PS-20 0,2% (trọng lượng/thể tích) và quy trình phối trộn được mô tả trong ví dụ 38, được định liều như sau: (1) 1µg PnPs (6C, 10A, 15A, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31 hoặc 35B, mỗi kiểu được liên hợp với CRM197) với 62,5µg chất phụ trợ nhôm phosphat (APA) trong mỗi lần tạo miễn dịch, hoặc (2) 2µg PnPs (15C- CRM197 với 125µg APA trong mỗi lần tạo miễn dịch. Huyết thanh được gom trước khi nghiên cứu bắt đầu (tiền miễn dịch) và vào ngày 14 (sau liều 1, PD1) và 28 (sau liều 2, PD2). NZWR được quan sát về bất kỳ dấu hiệu ốm yếu hoặc kiệt sức nào ít nhất là hằng ngày bởi đội ngũ chăm sóc động vật đã được đào tạo. Dạng phối trộn vaccin trong NZWR có vẻ là an toàn và được dung nạp tốt, do không có sự kiện có hại liên quan đến vaccin nào được ghi lại. Tất cả các thí nghiệm ở động vật được thực hiện nghiêm ngặt theo các khuyến cáo trong Hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của các Viện Y tế Quốc gia. Phương pháp thí nghiệm NZWR được phê duyệt bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật ở cả Merck & Co., Inc. (Kenilworth, NJ) và Covance (Denver, PA).

Huyết thanh NZWR được thử nghiệm trong thử nghiệm ELISA để đánh giá tính sinh miễn dịch của IgG bằng cách sử dụng 1-2mg/mL nồng độ phủ PnPs tương ứng. Kháng thể chức năng được xác định thông qua thử nghiệm thực bào bởi opsonin (OPA) dựa trên các phương pháp được mô tả từ trước sẵn có trực tuyến tại Thư viện vi khuẩn gây bệnh đường hô hấp tham khảo tại trường đại học Alabama ở Birmingham bằng cách sử dụng phần mềm Opsotiter® 3 (UAB Research Foundation, Caro-Aguilar *et al.* Khác biệt tính sinh miễn dịch của vacxin liên hợp polysaccharit phế cầu khuẩn hóa trị 15 (PCV15) dựa trên liều vacxin, đường tạo miễn dịch và chủng chuột nhắt. *Vaccine* 35(6):865-72 (2017); Burton *et al.* Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (MOPA4) for pneumococcal antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 13(9):1004-9 (2006)).

Tất cả các vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị một được phát hiện ra là sinh miễn dịch ở thỏ (Fig.15) và tạo ra kháng thể chức năng tiêu diệt chủng vi khuẩn tương ứng (Fig.16).

Ví dụ 42

Đánh giá sự bảo vệ chéo của các kiểu huyết thanh 15A, 15B, 15C

Thỏ được tạo miễn dịch bằng 15A- CRM197/APA, 15B- CRM197/APA hoặc 15C- CRM197/APA để đánh giá tính phản ứng chéo giữa mỗi kiểu huyết thanh.

Thỏ trắng trưởng thành New Zealand (NZWR, n=3/nhóm) được tạo miễn dịch trong cơ (IM) bằng 0,5ml vacxin liên hợp hóa trị một tương ứng vào ngày 0 và ngày 14 (đôi bên). Vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị một, được phối trộn trong L-histidin 20mM, độ pH = 5,8, NaCl 150mM, và PS-20 0,2% (trọng lượng/thể tích) và quy trình phối trộn được mô tả trong ví dụ 38, được định liều ở 2µg PnPs (mỗi kiểu huyết thanh 15A, 15B hoặc 15C được liên hợp với CRM197) với 125µg APA trong mỗi lần tạo miễn dịch. Huyết thanh được gom trước khi nghiên cứu bắt đầu (tiền miễn dịch) và vào ngày 14 (sau liều 1, PD1) và 28 (sau liều 2, PD2). NZWR được quan sát về bất kỳ dấu hiệu ốm yếu hoặc kiệt sức nào ít nhất là hằng ngày bởi đội ngũ chăm sóc động vật đã được đào tạo. Dạng phối trộn vacxin trong NZWR có

về là an toàn và được dung nạp tốt, do không có sự kiện có hại liên quan đến vaccin nào được ghi lại. Tất cả các thí nghiệm ở động vật được thực hiện nghiêm ngặt theo các khuyến cáo trong Hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của các Viện Y tế Quốc gia. Phương pháp thí nghiệm NZWR được phê duyệt bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật ở cả Merck & Co., Inc và Covance (Denver, PA).

Huyết thanh NZWR được thử nghiệm trong thử nghiệm ELISA để đánh giá tính sinh miễn dịch của IgG bằng cách sử dụng 1-2mg/mL nồng độ phủ PnPs tương ứng. Kháng thể chức năng được xác định thông qua OPA dựa trên các phương pháp được mô tả từ trước sẵn có trực tuyến tại Thư viện vi khuẩn gây bệnh đường hô hấp tham khảo tại trường đại học Alabama ở Birmingham bằng cách sử dụng phần mềm Opsotiter® 3 (UAB Research Foundation (Caro-Aguilar *et al.*, 2017; Burton *et al.*, 2006).

Tất cả ba vaccin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị một của nhóm huyết thanh 15 được phát hiện ra là sinh miễn dịch ở thỏ (Fig.17) và tạo ra kháng thể chức năng tiêu diệt chủng vi khuẩn tương ứng (Fig.18). Ngoài ra, thỏ được tạo miễn dịch bằng vaccin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị một nhóm huyết thanh 15 có độ chuẩn IgG của PD2 và độ chuẩn OPA tương đương lần lượt với polysacarit đồng nhất và không đồng nhất và chủng vi khuẩn. Thỏ được tạo miễn dịch bằng 15A-CRM197/APA, 15B-CRM197/APA hoặc 15C-CRM197/APA, tất cả đều có tính phản ứng chéo với mỗi polysacarit phế cầu khuẩn (15A, 15B, 15C) (Fig.17). Bằng cách sử dụng dữ liệu IgG biến đổi logarit sau liều 2 (PD2) được phân tích bởi ANOVA một chiều với thử nghiệm nhiều so sánh Tukey (giá trị $P=0,354$), thì không có chênh lệch đáng kể ở độ chuẩn IgG trên nhóm huyết thanh 15. Ngoài ra, thỏ được tạo miễn dịch bằng 15A-CRM197/APA, 15B-CRM197/APA hoặc 15C-CRM197/APA, tất cả đều có tính phản ứng chéo đối với mỗi chủng vi khuẩn *S. pneumoniae*, (15A, 15B, 15C), do tất cả các huyết thanh thỏ miễn dịch cao đều có kháng thể chức năng đối với mỗi chủng được đánh giá và tiêu diệt vi khuẩn (Fig.18). Tương tự, bằng cách sử dụng dữ liệu OPA biến đổi logarit sau liều 2 (PD2) được phân tích bởi ANOVA một chiều với thử nghiệm nhiều so sánh Tukey (giá trị $P=0,054$), thì không có chênh lệch đáng kể ở độ chuẩn OPA trên nhóm huyết thanh 15.

Ví dụ 43

Tính sinh miễn dịch của PCV21 ở thỏ trắng New Zealand

Thỏ trắng trưởng thành New Zealand (NZWR, n=5/nhóm) được tạo miễn dịch trong cơ (IM) bằng 0,1-0,5mL vaccin liên hợp phẩy cầu khuẩn vào ngày 0 và ngày 14 (đôi bên). Vaccin phẩy cầu khuẩn PCV21, được phối trộn trong L-histidin 20mM, độ pH = 5,8, NaCl 150mM, và PS-20 0,2% (trọng lượng/thể tích) và quy trình phối trộn được mô tả trong ví dụ 38, được định liều ở 4, 2, 1, 0,4, 0,08 hoặc 0,016µg PnPs (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F hoặc 35B, mỗi kiểu được liên hợp với CRM197) trong mỗi lần tạo miễn dịch. Huyết thanh được gom trước khi nghiên cứu bắt đầu (tiền miễn dịch) và vào ngày 14 (sau liều 1, PD1) và 28 (sau liều 2, PD2). NZWR được quan sát về bất kỳ dấu hiệu ốm yếu hoặc kiệt sức nào ít nhất là hằng ngày bởi đội ngũ chăm sóc động vật đã được đào tạo. Dạng phối trộn vaccin trong NZWR có vẻ là an toàn và được dung nạp tốt, do không có sự kiện có hại liên quan đến vaccin nào được ghi lại. Tất cả các thí nghiệm ở động vật được thực hiện nghiêm ngặt theo các khuyến cáo trong Hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của các Viện Y tế Quốc gia. Phương pháp thí nghiệm NZWR được phê duyệt bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật ở cả Merck & Co., Inc và Covance (Denver, PA).

Huyết thanh NZWR được đánh giá về tính sinh miễn dịch của IgG bằng cách sử dụng thử nghiệm điện hóa phát quang đa hợp (ECL). Thử nghiệm này được phát triển để sử dụng với huyết thanh thỏ dựa trên thử nghiệm ở người được mô tả trong Marchese *et al.* (*Clin Vaccine Immunol.* 16(3): 387-96 (2009)) bằng cách sử dụng công nghệ được phát triển bởi MesoScale Discovery (một phòng thuộc MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) sử dụng chất đánh dấu SULFO-TAG™ phát ra ánh sáng khi kích thích quang hóa. Kháng IgG thỏ được đánh dấu SULFO-TAG™ được sử dụng làm kháng thể thứ cấp để thử nghiệm các mẫu huyết thanh NZWR. Kháng thể chức năng được xác định thông qua thử nghiệm thực bào bởi opsonin đa hợp (MOPA) dựa trên các phương pháp được mô tả từ trước sẵn có trực tuyến tại Thư viện vi khuẩn gây bệnh đường hô hấp tham khảo tại trường đại học

Alabama ở Birmingham bằng cách sử dụng phần mềm Opsotiter® 3 (UAB Research Foundation, Caro-Aguilar *et al*, 2017, nêu trên, Burton *et al.*, 2006, nêu trên).

Vaccin liên hợp phế cầu khuẩn PCV21 được phát hiện ra là sinh miễn dịch ở thỏ (Fig.19A, 19B, 20A, và 20B) và tạo ra kháng thể chức năng tiêu diệt các chủng vi khuẩn kiểu vaccin (Fig.21A và 21B) ở tất cả các liều thử nghiệm.

Tính sinh miễn dịch PD1 so sánh được được quan sát đối với PCV21 định liều ở 4, 2, 1 và 0,4 μ g trong mỗi PnPs, ngoại trừ 24F có tính sinh miễn dịch cao hơn ở liều 2 μ g so với liều 4 hoặc 1 μ g và 15A, 15B và 15C có tính sinh miễn dịch cao hơn ở liều 0,4 μ g so với liều 2 μ g (Fig.19A và Fig.19B). Do đó, không có nhiều đáp ứng liều vaccin ở các liều PnPs cao hơn (0,4-4 μ g/PnPs). Tính sinh miễn dịch thấp hơn được quan sát ở liều vaccin PnPs 0,08 và 0,016 μ g, do nhiều kiểu huyết thanh thấp hơn đáng kể khi so với liều vaccin 2 μ g.

Tính sinh miễn dịch PD2 so sánh được được quan sát đối với PCV21 định liều ở 4, 2, 1 và 0,4 μ g trong mỗi PnPs (Fig.20A và Fig.20B).

Nhìn chung, các độ chuẩn MOPA của PD2 so sánh được được quan sát đối với PCV21 được định liều ở 4, 2, 1 và 0,4 μ g trong mỗi PnPs với độ chuẩn MOPA có xu hướng thấp hơn đối với liều vaccin PnPs 0,08 và 0,016 μ g, mặc dù nhiều độ chuẩn không đạt ý nghĩa thống kê (dữ liệu không được thể hiện trên hình vẽ). PCV21 được định liều ở 2 μ g trong mỗi PnPs được chọn lọc làm tập dữ liệu đại diện cho MOPA. Cụ thể, thỏ được tạo miễn dịch bằng PCV21 ở liều 2 μ g có độ chuẩn MOPA PD1 đối với tất cả các kiểu huyết thanh cao hơn đáng kể so với huyết thanh thỏ tiền miễn dịch ngoài kiểu huyết thanh 3 (Fig.21A). Nên lưu ý rằng huyết thanh thỏ tiền miễn dịch từ nghiên cứu này có độ chuẩn cơ sở cao hơn đối với các kiểu huyết thanh 16F, 31 và 35B. Thỏ được tạo miễn dịch bằng PCV21 ở liều 2 μ g có độ chuẩn MOPA PD2 đối với tất cả các kiểu huyết thanh cao hơn đáng kể so với huyết thanh thỏ tiền miễn dịch (Fig.21B). Dữ liệu biến đổi logarit được phân tích bởi ANOVA một chiều với kiểm định Dunnett để xác định ý nghĩa.

Ví dụ 44

Vật liệu và phương pháp

Thử nghiệm polysacarit tự do

Polysacarit tự do (polysacarit không được liên hợp với CRM197) trong mẫu liên hợp được đo bằng cách kết tủa đầu tiên protein tự do và các thể tiếp hợp với deoxycholat (DOC) và axit clohydric. Sau đó các chất kết tủa được lọc ra và dịch lọc được phân tích về nồng độ polysacarit tự do bởi HPSEC/UV/MALS/RI. Polysacarit tự do được tính dưới dạng phần trăm của tổng polysacarit được đo bởi HPSEC/UV/MALS/RI.

Thử nghiệm protein tự do

Polysacarit tự do, thể liên hợp polysacarit-CRM197, và CRM197 tự do trong các mẫu liên hợp được tách bằng phương pháp điện di mao dẫn trong chế độ sắc ký điện động mixen (micellar electrokinetic chromatography-MEKC). Nói một cách ngắn gọn, các mẫu được trộn với chất đệm vận hành MEKC chứa borat 25mM, SDS 100mM, độ pH= 9,3, và được tách trong mao dẫn silica dung hợp trần đã định trước tình trạng. Việc tách được theo dõi ở 200nm và CRM197 tự do được định lượng với đường cong tiêu chuẩn CRM197. Các kết quả protein tự do được báo cáo dưới dạng phần trăm của tổng hàm lượng protein được xác định bởi quy trình HPSEC/UV/MALS/RI.

Phân tích phân tử lượng và nồng độ của các thể liên hợp bằng cách sử dụng thử nghiệm HPSEC/UV/MALS/RI

Các mẫu liên hợp được phun và được tách bằng phương pháp sắc ký hiệu năng cao loại trừ kích cỡ (high performance size-exclusion chromatography-HPSEC). Việc dò tìm được thực hiện bằng máy dò tia cực tím (UV), tán xạ ánh sáng nhiều lớp (MALS) và chỉ số khúc xạ (RI) theo dãy. Nồng độ protein được tính từ UV280 bằng cách sử dụng hệ số tắt. Nồng độ polysacarit được giải chấp từ tín hiệu RI (được đóng góp với cả protein và polysacarit) bằng cách sử dụng hệ số dn/dc là sự thay đổi ở chỉ số khúc xạ của dung dịch với sự thay đổi ở nồng độ hòa tan được báo cáo theo mL/g. Phân tử lượng trung bình của các mẫu được tính bởi phần mềm

Astra (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA) bằng cách sử dụng nồng độ đo được và thông tin tán xạ ánh sáng trên toàn bộ pic mẫu. Có nhiều hình thức giá trị trung bình của phân tử lượng đối với các phân tử phân tán nhiều lần. Ví dụ, phân tử lượng trung bình số M_n , phân tử lượng trung bình trọng số M_w , và phân tử lượng trung bình za M_z (Molecules, 2015, 20, 10313-10341). Trừ khi có quy định cụ thể, các phân tử lượng là phân tử lượng trung bình trọng số.

Xác định sự tiêu thụ lysin trong protein được liên hợp dưới dạng số đo số lượng gắn cộng hóa trị giữa polysaccharit và protein mang

Phép phân tích axit amin Waters AccQ-Tag (AAA) được sử dụng để đo mức độ liên hợp trong các mẫu liên hợp. Các mẫu được thủy phân bằng cách sử dụng phương pháp thủy phân axit pha hơi trong trạm làm việc Eldex, để phá vỡ các protein mang thành các axit amin thành phần của chúng. Các axit amin tự do được dẫn xuất ra bằng cách sử dụng 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamat (AQC). Các mẫu đã được dẫn xuất sau đó được phân tích bằng cách sử dụng UPLC với dò tìm UV trên cột C18. Nồng độ protein trung bình thu được bằng cách sử dụng các axit amin đại diện ngoài lysin. Mức tiêu thụ lysin trong quá trình liên hợp (tức là, hao hụt lysin) được xác định bằng chênh lệch giữa lượng trung bình đo được của lysin trong thể liên hợp và lượng lysin được mong đợi trong protein ban đầu.

Ví dụ 45

Ảnh hưởng của quy trình liên hợp đến tính cân bằng của vacxin liên hợp phế cầu khuẩn

Các thể liên hợp polysaccharit-protein phế cầu khuẩn riêng rẽ được tạo ra bằng cách sử dụng các dung môi amin hóa khử khác nhau (chứa nước hoặc DMSO) như được mô tả trong các ví dụ, nêu trên, được sử dụng để phối trộn sản phẩm thuốc vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 1, 7, 14, và 21 được đề cập đến là PCV1, PCV7, PCV14 và PCV21 ở 84 µg/mL.

Vật chứa được làm đầy vacxin sản phẩm thuốc được đặt ở nhiệt độ 4°C hoặc 37°C trong thời gian lên đến 7 ngày. Quang phổ huỳnh quang protein nội tại (IPFS)

được sử dụng để đánh giá tính cân bằng của protein mang được liên hợp polysacarit phế cầu khuẩn, CRM197, trong chế phẩm PCV1, PCV7, PCV14 hoặc PCV21 khi bảo quản trong thời gian lên đến ở nhiệt độ 4°C và 37°C. Phổ phát xạ huỳnh quang (Em 290-400 nm) của các mẫu không được pha loãng được gom bằng cách sử dụng máy đo quang phổ kế Jasco FP-6500 ở nhiệt độ môi trường trong phòng trong cuvet thạch anh chiều dài đường 1cm. Bước sóng kích thích 280nm được sử dụng với tốc độ quét là 100nm/phút và băng thông kích thích và phát xạ là 3nm.

Như được thể hiện trên Fig.22A-Fig.22C, các dạng phối trộn sản phẩm thuốc chứa tất cả các thể liên hợp polysacarit-protein được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ, DMSO) dẫn đến tính cân bằng vật lý và hóa học tốt hơn so với vaccin sử dụng tất cả các thể liên hợp polysacarit-protein được tạo ra bằng cách sử dụng dung môi chứa nước trong phản ứng amin hóa khử trong quy trình liên hợp (protic). Trong khoảng thời gian ngắn là 16 giờ ở nhiệt độ 37°C, cường độ huỳnh quang của sản phẩm thuốc PCV1, PCV7 và PCV14 được tạo ra bằng cách sử dụng tất cả các thể liên hợp polysacarit-protein được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi chứa nước ở 84µg/mL PnPs được làm giảm và mức phát xạ lớn nhất của vaccin được chuyển đổi từ 332nm đến 338nm. Sản phẩm thuốc vaccin PCV1, PCV7 và PCV14, ở 84µg/mL PnPs, sử dụng các dược chất được tạo ra bằng hóa học amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ, DMSO) không thể hiện sự thay đổi ở cường độ huỳnh quang hoặc mức phát xạ lớn nhất ở 338nm. Ngoài ra, sản phẩm thuốc PCV21 cũng được nghiên cứu. Sản phẩm này được phối trộn trong L-histidin 20mM, độ pH = 5,8, NaCl 150mM, và PS-20 0,1% (trọng lượng/thể tích) như được mô tả trong ví dụ 38, chứa thể liên hợp polysacarit-protein được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ, DMSO). Nghiên cứu này cho thấy tính cân bằng vật lý và hóa học tốt hơn sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C. PCV21 không thể hiện sự thay đổi ở cường độ huỳnh quang hoặc mức phát xạ lớn nhất 338nm (Fig.22D).

Nên hiểu rằng cường độ tín hiệu thu được và mức phát xạ lớn nhất đạt được từ phép đo IPFS (ví dụ 40) là do tính cân bằng tổng hợp của từng thể liên hợp polysacarit-protein riêng rẽ trong sản phẩm thuốc phức hợp đa hóa trị. Các tác giả

sáng chế cho thấy rằng sản phẩm thuốc vacxin sử dụng tất cả các thể liên hợp polysacarit-protein được tạo ra trong dung môi aprotic đều ổn định trong khi sản phẩm thuốc vacxin sử dụng tất cả các được chất được tạo ra trong dung môi protic không ổn định trong điều kiện có ứng suất. Nếu chế phẩm sản phẩm thuốc vacxin chứa hỗn hợp của các thể liên hợp polysacarit-protein sử dụng cả quy trình liên hợp protic và aprotic, thì trung bình mức phát xạ lớn nhất hoặc cường độ được đo từ sản phẩm thuốc sẽ được tính trọng số do sự góp phần của mỗi sự phát xạ thể liên hợp polysacarit-protein protic ở 332nm và mỗi sự phát xạ thể liên hợp polysacarit-protein aprotic ở 338nm. Mong đợi rằng sự thay đổi có trọng số sẽ diễn ra, ở cường độ hoặc mức phát xạ lớn nhất, khi nhiệt độ gia tăng đối với hỗn hợp này do sự có mặt của các thể liên hợp polysacarit protein được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình liên hợp protic.

Như được thể hiện trên Fig.23, để đánh giá tính cân bằng của sản phẩm thuốc PCV21 được tạo ra ở 0,084mg/mL PnPs, thì phân tích theo dấu vết hạt nano (NTA) được sử dụng. Kỹ thuật này thu thập các video về tập hợp hạt nano có dấu vết một cách trực tiếp khi chúng dịch chuyển bởi chuyển động Brownian để ngoại suy cỡ hạt và nồng độ. Laze nhóm 1, 635nm tập trung chùm laze đỏ 80micron thông qua mẫu lỏng, chiếu sáng các hạt dưới dạng các điểm sáng lan tỏa nhanh. Camema CCD ghi lại 30 khung trong mỗi video thứ hai để lần dấu vết dịch chuyển của mỗi hạt đã chiếu sáng riêng rẽ theo thời gian. Phần mềm hệ thống nhận diện tâm của từng hạt riêng rẽ từ video và tìm dấu vết khoảng cách đã đi qua một cách độc lập để xác định mức dịch chuyển bình phương trung bình. Việc lần dấu vết này được thực hiện đồng thời với mọi hạt trong tập hợp mẫu trong mỗi khung cho đến khi dữ liệu thô được thu thập từ toàn bộ video được phân tích. Bằng cách đo đồng thời mức dịch chuyển bình phương trung bình của mọi hạt riêng rẽ được lần dấu vết, thì hệ số lan tỏa (D_t) của nó và bán kính thủy động độ cầu tương đương (r_h) được xác định bằng cách áp dụng đẳng thức Stokes-Einstein. Sau đó phần mềm này trình bày dữ liệu đã thu thập này dưới dạng sự phân bố theo cỡ hạt và nồng độ. Thông tin dữ liệu sơ bộ không những về cỡ hạt và nồng độ, mà còn về cường độ, hoặc độ sáng của từng hạt riêng rẽ được tập hợp lại. Tổng hợp lại, dữ liệu được khớp và vẽ biểu đồ một cách riêng rẽ dưới dạng cường độ hạt so với cỡ hạt, và nồng độ hạt so với cỡ hạt, và sau đó trên

biểu đồ biên dạng ba chiều so sánh cỡ hạt, nồng độ, và cường độ của tất cả các tập hợp hạt.

Vacxin liên hợp gồm có protein mang và kháng nguyên polysacarit có thể dễ bị tích tụ cùng nhau hoặc tách biệt trong khoảng cỡ hạt từ 10 đến 1000nm, từ đó khiến cho NTA có tính cân bằng thích hợp biểu thị kỹ thuật đánh giá và định lượng hiện tượng tích tụ. Khi sản phẩm thuốc tiếp xúc với nhiệt độ 4°C và 37°C trong 1 tuần, thì không có sự tích tụ đáng kể nào của sản phẩm thuốc được quan sát bởi NTA đối với các dạng phối trộn chứa PS-20 ở nồng độ của 0,025% trọng lượng/thể tích, 0,05% trọng lượng/thể tích, 0,1% trọng lượng/thể tích, 0,15% trọng lượng/thể tích, và 0,2% trọng lượng/thể tích PS20 (như được thể hiện trên Fig.23). Tuy nhiên, sau khi đưa các dạng phối trộn này vào khuấy trong 6 giờ ở nhiệt độ 4°C, thì dạng phối trộn thiếu polysorbate 20 không hiệu quả trong việc giảm nhẹ tích tụ do việc khuấy của sản phẩm thuốc như được chứng minh bởi cỡ hạt D90 tăng, sự phân bố theo cỡ hạt rộng, và cường độ hạt tăng như được cung cấp bởi NTA. Do đó, ưu tiên duy trì polysorbate 20 ở nồng độ 0,025 đến 0,2% hoặc cao hơn (trọng lượng/thể tích) để làm ổn định sản phẩm thuốc trong quá trình sản xuất, bảo quản, vận chuyển và xử lý thông thường.

Như được mô tả trong ví dụ 39, HPSEC UV/MALS/RI được sử dụng để đo phân tử lượng của sản phẩm thuốc liên hợp polysacarit-protein hóa trị 21 (PCV21), được phối trộn trong L-histidin 20mM, độ pH = 5,8, NaCl 150mM, và PS-20 0 đến 0,2% (trọng lượng/thể tích) và quy trình phối trộn được mô tả trong ví dụ 38. Các dạng phối trộn được đặt ở nhiệt độ 4°C hoặc 37°C trong thời gian lên đến một tuần. Trong một số trường hợp, các xi lanh được đặt trên bộ xoay ngang và được lắc trong thời gian lên đến 6 giờ sau khi bảo quản trong 1 tuần ở nhiệt độ 4°C hoặc 37°C. Việc này được thực hiện để kích thích ứng suất vận chuyển và xử lý mà có thể đi kèm với quá trình sản xuất và phân phối sản phẩm thuốc. Nếu thể liên hợp polysacarit-protein trong sản phẩm thuốc thoái biến hoặc khử polyme hóa, thì sự giảm phân tử lượng sẽ rõ rệt và nếu sự tích tụ dạng phối trộn sản phẩm thuốc diễn ra, thì sự tăng phân tử lượng sẽ diễn ra. Phép đo này đem lại đặc trưng bổ sung về chất lượng của sản phẩm thuốc vacxin hoặc thể liên hợp polysacarit-protein dưới

dạng chức năng của nồng độ PS-20. Như được thể hiện trên Fig.24, dạng phối trộn sản phẩm thuốc PCV21 chứa tất cả các dược chất, trong đó mỗi dược chất được bảo chế bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (ví dụ, DMSO) ổn định chống lại sự khử polyme hóa hoặc sự thoái biến hóa học của hydrat cacbon và ổn định chống lại sự tích tụ protein trong dạng phối trộn sản phẩm thuốc này do xử lý nhiệt từ 0,05% đến 0,15% PS-20. Nói tóm lại, điều này chỉ ra rằng sản phẩm thuốc PCV21 ổn định qua nhiệt độ gia tăng và các ứng suất vật lý khi được phối trộn bằng cách sử dụng PS-20 ở nồng độ từ 0,025% đến 0,2% hoặc nồng độ cao hơn.

Ví dụ 46

Bảo vệ PCV21 khỏi thách thức ở chuột nhắt

Chuột nhắt cái chưa lớn Swiss Webster (6-8 tuần tuổi, n=10/nhóm) được tạo miễn dịch trong bụng (IP) bằng 0,1-0,5mL vaccin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 21 (PCV21) vào ngày 0, ngày 14, và ngày 28. Vaccin phế cầu khuẩn PCV21 được định liều ở 4, 2, 0,4, 0,08 hoặc 0,016µg PnPs (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F và 35B, mỗi kiểu này được liên hợp với CRM197) trong mỗi lần tạo miễn dịch. Chuột nhắt được quan sát về bất kỳ dấu hiệu ốm yếu hoặc kiệt sức nào ít nhất là hằng ngày bởi đội ngũ chăm sóc động vật đã được đào tạo. Dạng phối trộn vaccin ở chuột nhắt có vẻ là an toàn và được dung nạp tốt, do không có sự kiện có hại liên quan đến vaccin nào được ghi lại. Vào ngày 52, chuột nhắt được thách thức trong khí quản với kiểu huyết thanh 24F *Streptococcus pneumoniae*. Môi trường nuôi cấy pha mũ của *S. pneumoniae* được ly tâm, được rửa, và được tạo hỗn dịch trong PBS vô trùng. Chuột nhắt được gây mê bằng isofluran trước khi thách thức. 105cfu của *S. pneumoniae* trong 0,1mL PBS được đặt trong cổ họng của chuột nhắt được mắc thẳng đứng bởi răng cửa của chúng. Việc hút vi khuẩn được cảm ứng bằng cách kéo nhẹ lưỡi ra ngoài và che lỗ mũi. Chuột nhắt được cân hằng ngày và được trợ tử nếu mức sụt cân vượt quá 20% trọng lượng ban đầu. Máu được gom vào 24 giờ, 48 giờ, và 72 giờ để đánh giá vãng khuẩn huyết. Chuột nhắt được quan sát ít nhất hai lần hằng ngày bởi đội ngũ chăm sóc động vật đã được đào tạo về bất kỳ dấu hiệu ốm yếu hoặc kiệt sức nào. Tất cả

các thí nghiệm ở động vật được thực hiện nghiêm ngặt theo các khuyến cáo trong Hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của các Viện Y tế Quốc gia. Phương pháp thí nghiệm ở chuột nhất được phê duyệt bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật ở Merck & Co., Inc.

Huyết thanh chuột nhất được đánh giá tính sinh miễn dịch của IgG bằng cách sử dụng thử nghiệm điện hóa phát quang đa hợp (ECL). Thử nghiệm này được phát triển để sử dụng với huyết thanh chuột nhất dựa trên thử nghiệm ở người được mô tả trong Marchese et al., Clin Vaccine Immunol. (2009) 16(3):387-96, bằng cách sử dụng công nghệ được phát triển bởi MesoScale Discovery (một phòng thuộc MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) sử dụng chất đánh dấu SULFO-TAG™ phát ra ánh sáng khi kích thích quang hóa. Kháng IgG chuột nhất được đánh dấu SULFO-TAG™ được sử dụng làm kháng thể thứ cấp để thử nghiệm các mẫu huyết thanh chuột nhất. Kháng thể chức năng được xác định thông qua thử nghiệm thực bào bởi opsonin đa hợp (MOPA) dựa trên các phương pháp được mô tả từ trước ở www.vaccine.uab.edu và phần mềm Opsotiter® 3 được sở hữu và cấp phép bởi đại học Alabama (UAB) Research Foundation (xem, Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 và Burton R.L. and Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Việc tạo miễn dịch PCV21 tạo ra các độ chuẩn kháng thể ở chuột nhất Swiss Webster đối với tất cả các kiểu huyết thanh trong vacxin (dữ liệu không được thể hiện trên hình vẽ). PCV21 cũng có tính miễn dịch trong chuột nhất Balb/c và CD1 (dữ liệu không được thể hiện trên hình vẽ). Chuột nhất Swiss Webster được tạo miễn dịch bằng PCV21 cũng được bảo vệ tránh thách thức bằng kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 24F (Fig.25). Kiểm định Mantel Cox log-rank chỉ ra rằng tất cả các nhóm được tạo miễn dịch bằng PCV21 được bảo vệ một cách đáng kể khỏi thách thức khi so với nhóm còn non ($P < 0,05$). Tương tự, các nhóm chuột nhất được tạo miễn dịch bằng PCV21 có từ ít đến không có vãng khuẩn huyết, mà ít hơn một cách đáng kể khi so với nhóm còn non (dữ liệu không được thể hiện trên hình vẽ).

Ví dụ 47

Tính sinh miễn dịch PCV và kháng thể chức năng ở thỏ

Thỏ trắng trưởng thành New Zealand (NZWR, n=5/nhóm) được tạo miễn dịch trong cơ (IM) bằng 0,1mL PCV vào ngày 0 và ngày 14 (đôi bên). PCV được định liều ở 0,4µg PnPs trong mỗi kiểu huyết thanh trong mỗi lần tạo miễn dịch với 25µg [Al] dưới dạng chất phụ trợ nhôm phosphat (APA). Trong trường hợp PCV31, nồng độ định liều của kiểu huyết thanh 6B được gấp đôi lên 0,8µg PnPs trong mỗi lần tạo miễn dịch. PCV21 (như được mô tả trong ví dụ 38) chứa polysacarit đã tinh chế từ các kiểu huyết thanh 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F và 35B, mỗi kiểu được liên hợp với CRM197. Mỗi thể liên hợp polysacarit-protein được tạo ra không được phụ trợ hoặc phối trộn với 250µg [Al]/mL dưới dạng nhôm phosphat hoặc APA để đánh giá tác dụng của chất phụ trợ (PCV21/APA). PCV hóa trị thấp hơn cũng được phối trộn (như được mô tả trong ví dụ 38) để bao gồm 8 ST mới (PCV8: 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B, mỗi kiểu này được liên hợp với CRM197, không được phụ trợ), 16 ST không được bao gồm trong PCV được cấp phép bất kỳ (PCV16: 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 20, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B, mỗi kiểu được liên hợp với CRM197, không được phụ trợ) hoặc PCV31 (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B, mỗi kiểu được liên hợp với CRM197, được phối trộn với 250µg [Al]/mL dưới dạng nhôm phosphat) để đánh giá sự ức chế chất mang khi hóa trị vacxin gia tăng (PCV31/APA). Mỗi vacxin sử dụng các thể liên hợp polysacarit protein được phối trộn ở 4µg/mL (trọng lượng/thể tích) polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs), ngoại trừ đối với 6B được phối trộn ở 8µg/mL (trọng lượng/thể tích) polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) trong PCV31 hoặc PCV31/APA. Nồng độ cuối cùng của polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) trong mỗi vacxin là 128µg/mL PnPs trong PCV31, 84µg/mL PnPs trong PCV21, 64µg/mL trong PCV16 và 32µg/mL trong PCV8.

Huyết thanh được gom trước khi nghiên cứu bắt đầu (tiền miễn dịch) và vào ngày 14 (PD1) và 28 (PD2). NZWR được quan sát về bất kỳ dấu hiệu ốm yếu hoặc kiệt sức nào ít nhất là hằng ngày bởi đội ngũ chăm sóc động vật đã được đào tạo.

Dạng phối trộn vacxin trong NZWR có vẻ là an toàn và được dung nạp tốt, do không có sự kiện có hại liên quan đến vacxin nào được ghi lại. Tất cả các thí nghiệm ở động vật được thực hiện nghiêm ngặt theo các khuyến cáo trong Hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của các Viện Y tế Quốc gia. Phương pháp thí nghiệm NZWR được phê duyệt bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật ở cả Merck & Co., Inc và Covance (Denver, PA).

Huyết thanh thử được đánh giá về tính sinh miễn dịch của IgG bằng cách sử dụng thử nghiệm điện hóa phát quang đa hợp (ECL). Thử nghiệm này được phát triển để sử dụng với huyết thanh thử dựa trên thử nghiệm ở người được mô tả trong Marchese et al., Clin Vaccine Immunol. (2009) 16(3):387-96, bằng cách sử dụng công nghệ được phát triển bởi MesoScale Discovery (một phòng thuộc MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) sử dụng chất đánh dấu SULFO-TAG™ phát ra ánh sáng khi kích thích quang hóa. Kháng IgG thử được đánh dấu SULFO-TAG™ được sử dụng làm kháng thể thứ cấp để thử nghiệm các mẫu huyết thanh NZWR. Kháng thể chức năng được xác định thông qua thử nghiệm thực bào bởi opsonin đa hợp (MOPA) dựa trên các phương pháp được mô tả từ trước ở www.vaccine.uab.edu và phần mềm Opsotiter® 3 được sở hữu và cấp phép bởi đại học Alabama (UAB) Research Foundation (xem, Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 và Burton R.L. and Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Huyết thanh thử được thử nghiệm dưới dạng tập hợp đối với tiền miễn dịch và PD1, và riêng rẽ đối với PD2 trong thử nghiệm điện hóa phát quang đa hợp để xác định độ chuẩn kháng thể. PCV tạo ra độ chuẩn kháng thể ở thử đối với tất cả các kiểu huyết thanh sau khi tạo miễn dịch bằng vacxin (dữ liệu không được thể hiện trên hình vẽ). Polysacarit kiểu huyết thanh 15B không được chứa trong PCV16, PCV21 hoặc PCV31, tuy nhiên độ chuẩn kháng thể đối với kiểu huyết thanh 15B được quan sát sau khi tạo miễn dịch với cả PCV16, PCV21 và PCV31.

PCV21 không chứa chất phụ trợ có tính sinh miễn dịch tương đương hoặc cao hơn đáng kể (các kiểu huyết thanh 3, 7F, 10A, 19A, 23A và 23B) khi so với

PCV21 có APA (Fig.26A-Fig.26B và Fig.28), đề xuất rằng không có lợi ích sinh miễn dịch bổ sung ở thỏ với APA có trong vaccin.

Sự ức chế epitop cảm ứng bởi chất mang dùng để chỉ sự can thiệp vào đáp ứng kháng thể đối với kháng nguyên (như polysacarit nang) được kết hợp với cùng một protein mang (như CRM197). Sự can thiệp này được cho là xuất phát từ sự cạnh tranh số lượng hạn chế của tế bào trợ giúp T đã mời và đặc hiệu chất mang. Kết quả là, có thể có sự giảm đáp ứng với polysacarit nang. Pfizer quan sát sự giảm tính sinh miễn dịch của vaccin của các kiểu huyết thanh dùng chung do hóa trị của vaccin tăng từ hóa trị 7 đến hóa trị 13 [So sánh GMC kháng thể IgG của Prevnar (hóa trị 7) với Prevnar13. (Bảng 9, trang 29 chuyên khảo PCV13)]. Do đó, các tác giả sáng chế tìm tòi để nghiên cứu tính sinh miễn dịch của các PCV hóa trị thấp hơn so với PCV21 (Fig.27A-Fig.27C). PCV8 (8 kiểu huyết thanh mới) có tính sinh miễn dịch tương đương so với PCV21 đối với 8 kiểu huyết thanh dùng chung (Fig.29). PCV16 (PCV21 trừ đi 5 kiểu huyết thanh trùng lặp từ PCV15) có tính sinh miễn dịch tương đương so với PCV21 đối với 15 trong số 16 kiểu huyết thanh dùng chung (Fig.29). Kiểu huyết thanh 31 có tính sinh miễn dịch cao hơn trong PCV16 (Fig.29). Nhìn chung, không có xu hướng chính trong việc ức chế chất mang bằng PCV21 trong NZWR. PCV31/APA có tính sinh miễn dịch tương đương so với PCV21/APA đối với 12 trong 21 kiểu huyết thanh dùng chung. 10 kiểu huyết thanh (6C, 7F, 9N, 12F, 15A, 15B (không có trong PCV21), 15C, 17F, 19A, và 23A) có tính sinh miễn dịch cao hơn trong PCV31, nằm trong khoảng từ gấp 2,9 lần đến 11 lần (Fig.30). Nhìn chung, không có xu hướng chính trong việc ức chế chất mang bằng PCV31 trong NZWR.

Các PCV được phát hiện ra là sinh miễn dịch ở thỏ và tạo ra các kháng thể chức năng tiêu diệt các chủng vi khuẩn kiểu vaccin. Huyết thanh thỏ được thử nghiệm trong thử nghiệm thực bào bởi opsonin đa hợp (MOPA) để xác định độ chuẩn kháng thể chức năng. PCV21 có độ chuẩn OPA PD2 tương đương hoặc cao hơn khi so với PCV21/APA, PCV8 và PCV16 (Fig.31). Dữ liệu biến đổi logarit được phân tích bởi ANOVA một chiều với kiểm định Dunnett để xác định ý nghĩa. PCV21 có độ chuẩn OPA cao hơn đáng kể đối với kiểu huyết thanh 16F so với

PCV8 và đối với các kiểu huyết thanh 12F, 23A và 19A so với PCV21/APA. PCV31 có độ chuẩn OPA cao hơn đáng kể đối với kiểu huyết thanh 23A so với PCV21.

Ví dụ 48

Tính sinh miễn dịch PCV21 ở khi rezut trưởng thành

PCV21 cũng được đánh giá về mô hình sinh miễn dịch ở khi rezut trưởng thành. Khi rezut được tạo miễn dịch trong cơ bằng PCV21 vào ngày 0, 28 và 56. PCV21 được định liều ở 1µg PnPs trong thể tích 0,25mL (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F và 35B, mỗi kiểu được liên hợp với CRM197) trong mỗi lần tạo miễn dịch. Huyết thanh được gom trước khi nghiên cứu bắt đầu (tiền miễn dịch, ngày 0) và vào ngày 14 (PD1), 28, 42 (PD2), 56, 70 (PD3) và 84.

Huyết thanh khi rezut được đánh giá về tính sinh miễn dịch của IgG bằng cách sử dụng thử nghiệm điện hóa phát quang đa hợp (ECL). Thử nghiệm này được phát triển để sử dụng với huyết thanh khi rezut dựa trên thử nghiệm ở người được mô tả trong Marchese et al. and Skinner et al. (Marchese R.D. et al., Clin. Vaccine Immunol. (2009) 16(3):387-96 và Skinner, J.M. et al., Vaccine (2011) 29(48):8870-8876) bằng cách sử dụng công nghệ được phát triển bởi MesoScale Discovery (một phòng thuộc MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) sử dụng chất đánh dấu SULFO-TAG™ phát ra ánh sáng khi kích thích quang hóa. Kháng IgG người được đánh dấu SULFO-TAG™ được sử dụng làm kháng thể thứ cấp để thử nghiệm các mẫu huyết thanh khi rezut. Kháng thể chức năng được xác định thông qua thử nghiệm thực bào bởi opsonin đa hợp (MOPA) dựa trên các phương pháp được mô tả từ trước ở www.vaccine.uab.edu và phần mềm Opsotiter® 3 được sở hữu và cấp phép bởi đại học Alabama (UAB) Research Foundation (xem, Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 và Burton R.L. and Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

PCV21 được phát hiện ra là sinh miễn dịch ở khi trưởng thành và tạo ra các kháng thể chức năng tiêu diệt các chủng vi khuẩn kiểu vaccin ở tất cả các thời điểm

thử nghiệm (Fig.32 và Fig.33). Cũng lưu ý rằng PCV21, chứa các thể liên hợp polysacarit 15A-CRM197 và 15C-CRM197, cũng đem lại tính phản ứng chéo cho 15B, như được chứng minh trong ECL. PCV21 sinh miễn dịch với một liều vacxin ở khi (Fig.32). Hầu hết các kiểu huyết thanh đạt độ chuẩn tối đa của chúng ở PD1, ngoại trừ ST 6C, 12F và 24F, có lợi từ các lần sinh miễn dịch bổ sung. Khi rezut trưởng thành có độ chuẩn kháng thể tồn tại từ trước cao hơn so với các nghiên cứu PCV cũ ở khi rezut mới sinh. Độ chuẩn kháng thể tồn tại từ trước khả biến nhất khi thử nghiệm các mẫu huyết thanh trong MOPA, khiến cho việc xác định độ chuẩn thực bào bởi opsonin trở nên khó khăn. Tất cả các thời điểm nghiên cứu được thử nghiệm trong MOPA dưới dạng các mẫu được gom lại hoặc các mẫu riêng lẻ, nhưng để dễ đánh giá hơn, thì chỉ có tiền miễn dịch, PD1 và PD3 được thể hiện (Fig.33), do không có nhiều chênh lệch ở các độ chuẩn OPA giữa PD1 và PD3.

Huyết thanh khi rezut trưởng thành được tạo miễn dịch bằng PCV21 được đánh giá về sự bảo vệ chéo đối với các vi khuẩn *S. pneumoniae* khác (Fig.34). Huyết thanh khi được tạo miễn dịch bằng PCV21 có sự bảo vệ chéo với các kiểu huyết thanh 6A, 6B và 23F nhưng không bảo vệ chéo với 19F. Sự bảo vệ chéo đối với 6A và 6B có thể là do việc tạo miễn dịch với thể liên hợp polysacarit 6C-CRM197 là một phần của PCV21 đa hóa trị. Tương tự, việc tạo miễn dịch với các thể liên hợp polysacarit 23A-CRM197 và 23B-CRM197 là một phần của PCV đa hóa trị dẫn đến sự bảo vệ chéo đối với kiểu huyết thanh 23F. Việc tạo miễn dịch với PCV21 chứa thể liên hợp polysacarit 19A-CRM197 không mang lại sự bảo vệ chéo đối với 19F.

Ví dụ 49

Tính sinh miễn dịch PCV21 ở khi rezut trưởng thành - đánh giá chất phụ trợ và sự ức chế chất mang

Một nghiên cứu ở khi khác bao gồm bước đánh giá PCV21 có và không có APA và bước so sánh tính sinh miễn dịch ở kiểu huyết thanh dùng chung để đánh giá sự ức chế chất mang. Khi rezut trưởng thành (n=5/nhóm) được tạo miễn dịch trong cơ bằng vacxin ở một nửa liều của người vào ngày 0 của nghiên cứu. PCV21 được định liều ở 1µg PnPs trong thể tích 0,25mL (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F,

...

15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F và 35B, mỗi kiểu được liên hợp với CRM197) trong mỗi lần tạo miễn dịch. Một nhóm bao gồm PCV21, được phụ trợ với 62,5µg [Al] dưới dạng nhôm phosphat. Một nhóm khác bao gồm PCV15 được định liều ở 1µg PnPs trong thể tích 0,25mL (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F, mỗi kiểu được liên hợp với CRM197 với 6B được định liều ở 2µg) trong mỗi lần tạo miễn dịch và được phụ trợ với 62,5µg [Al] dưới dạng nhôm phosphat. Một nhóm khác bao gồm Prevnar13® (PCV13) được định liều ở 1,1µg PnPs trong thể tích 0,25mL (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F, mỗi kiểu được liên hợp với CRM197 với 6B được định liều ở 2,2µg) trong mỗi lần tạo miễn dịch. Huyết thanh được gom trước khi nghiên cứu bắt đầu (tiền miễn dịch, ngày 0) và vào ngày 28.

PCV21 được phát hiện ra là sinh miễn dịch ở khi trưởng thành và tạo ra các kháng thể chức năng tiêu diệt các chủng vi khuẩn kiểu vaccin. PCV21 không có chất phụ trợ có tính sinh miễn dịch tương đương hoặc cao hơn đáng kể (các kiểu huyết thanh 15A và 15B) khi so với PCV21 có APA (Fig.35). PCV21 không chứa kiểu huyết thanh 15B.

Khi được tạo miễn dịch bằng PCV21 được so sánh với khi được tạo miễn dịch bằng PCV15 và Prevnar13. PCV21 và PCV15 có 5 kiểu huyết thanh dùng chung (3, 7F, 19A, 22F, 33F); không có chênh lệch ở tính sinh miễn dịch của 5 kiểu huyết thanh đó giữa các con khi được tạo miễn dịch bằng PCV21 hoặc PCV15 (Fig.36). PCV21 và Prevnar13 có 3 kiểu huyết thanh dùng chung (3, 7F, 19A); không có chênh lệch ở tính sinh miễn dịch đối với các kiểu huyết thanh 7F và 19A. Khi được tạo miễn dịch bằng Prevnar13 có độ chuẩn kháng thể thấp hơn đối với kiểu huyết thanh 3 so với PCV21 (Fig.36). Kết quả này nhất quán với dữ liệu lâm sàng của PCV15 ở người, cho thấy kiểu huyết thanh 3 miễn dịch nhiều hơn trong vaccin PCV15 của Merck. Kết hợp lại, các kết quả này đề xuất rằng sự ức chế chất mang không được quan sát thấy ở khi rezut trưởng thành được tạo miễn dịch bằng PCV21 khi so với Prevnar13 hoặc PCV15.

Ví dụ 50

Tính phản ứng chéo của kiểu huyết thanh 6A, 6B và 6C – nghiên cứu hóa trị một

Sản phẩm thuốc hóa trị một được bào chế bằng cách sử dụng thể liên hợp polysacarit phế cầu khuẩn 6A-CRM197 hoặc thể liên hợp polysacarit phế cầu khuẩn 6B-CRM197 và được phối trộn trong 20mM histidin độ pH = 5,8 và natri clorua 150mM và polysorbat-20 (PS-20) 0,1% trọng lượng/thể tích ở tổng nồng độ polysacarit mục tiêu bằng 4,0µg/mL của từng kiểu huyết thanh. Các thể liên hợp được tạo ra bằng cách liên hợp riêng rẽ protein CRM197 với các kiểu polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) (6A hoặc 6B). Thể tích của các thể liên hợp khối cần phải có để thu được nồng độ mục tiêu của từng kiểu huyết thanh riêng lẻ được tính dựa trên thể tích mẻ và nồng độ của từng nồng độ polysacarit khối. Các thể liên hợp riêng lẻ được bổ sung vào dung dịch chứa histidin, natri clorua và PS-20 để tạo ra hỗn hợp liên hợp 2X. Bình phối trộn chứa hỗn hợp liên hợp 2X này được trộn bằng cách sử dụng que khuấy từ, và được lọc vô trùng vào một bình khác. Hỗn hợp 2X đã được lọc vô trùng sau đó được pha loãng với nước muối để đạt được tổng nồng độ polysacarit và tá dược mong muốn mục tiêu. Sau đó, các dạng phối trộn được làm đầy vào các lọ và được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Thỏ được tạo miễn dịch bằng 6A-CRM197 hoặc 6B-CRM197 để đánh giá tính phản ứng chéo trong nhóm huyết thanh 6. Thỏ trắng trưởng thành New Zealand (NZWR, n=3/nhóm) được tạo miễn dịch trong cơ (IM) bằng 0,25mL vaccin liên hợp hóa trị một tương ứng vào ngày 0 và ngày 14 (đôi bên). Vaccin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị một, được phối trộn trong L-histidin 20mM độ pH = 5,8 NaCl 150mM và PS-20 0,1% (trọng lượng/thể tích) với quy trình phối trộn được mô tả trong ví dụ 38, được định liều ở 1µg PnPs (mỗi 6A hoặc 6B được liên hợp với CRM197). Huyết thanh được gom trước khi nghiên cứu bắt đầu (tiền miễn dịch) và vào ngày 14 (sau liều 1, PD1) và 28 (sau liều 2, PD2). NZWR được quan sát về bất kỳ dấu hiệu ốm yếu hoặc kiệt sức nào ít nhất là hằng ngày bởi đội ngũ chăm sóc động vật đã được đào tạo. Dạng phối trộn vaccin trong NZWR có vẻ là an toàn và được dung nạp tốt, do không có sự kiện có hại liên quan đến vaccin nào được ghi lại. Tất cả các thí nghiệm ở động vật được thực hiện nghiêm ngặt theo các khuyến cáo trong Hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của các Viện Y tế Quốc gia. Phương

pháp thí nghiệm NZWR được phê duyệt bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật ở cả Merck & Co., Inc và Covance (Denver, PA).

Huyết thanh NZWR được thử nghiệm trong thử nghiệm ELISA để đánh giá tính sinh miễn dịch của IgG bằng cách sử dụng nồng độ phủ PnPs tương ứng 2 µg/mL. Kháng thể chức năng được xác định thông qua thử nghiệm thực bào bởi opsonin (OPA) dựa trên các phương pháp được mô tả từ trước ở www.vaccine.uab.edu và phần mềm Opsotiter® 3 sở hữu và cấp phép từ tổ chức nghiên cứu UAB (xem, Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 và Burton R.L. và Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Cả 6A-CRM197 và 6B-CRM197 đều được phát hiện ra là sinh miễn dịch ở thỏ (Fig.37) và tạo ra kháng thể chức năng tiêu diệt chủng vi khuẩn tương ứng (Fig.38). Ngoài ra, thỏ được tạo miễn dịch bằng vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị một nhóm huyết thanh 6 có độ chuẩn IgG của PD2 và độ chuẩn OPA tương đương lần lượt với polysacarit đồng nhất và không đồng nhất và chủng vi khuẩn. Thỏ được tạo miễn dịch bằng 6A-CRM197 hoặc 6B-CRM197 đều có tính phản ứng chéo đối với mỗi polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs 6A, PnPs 6B và PnPs 6C) (Fig.37). Bằng cách sử dụng dữ liệu IgG biến đổi logarit sau liều 2 (PD2) được phân tích bởi ANOVA một chiều, thì không có chênh lệch đáng kể ở độ chuẩn IgG trên nhóm huyết thanh 6. Ngoài ra, thỏ được tạo miễn dịch bằng 6A-CRM197 hoặc 6B-CRM197 đều có tính phản ứng chéo đối với mỗi chủng vi khuẩn *S. pneumoniae* (6A, 6B và 6C), do tất cả các huyết thanh thỏ miễn dịch cao có kháng thể chức năng đối với mỗi chủng được đánh giá và tiêu diệt vi khuẩn (Fig.38). Tương tự, bằng cách sử dụng dữ liệu OPA biến đổi logarit sau liều 2 (PD2) được phân tích bởi ANOVA một chiều, thì không có chênh lệch đáng kể ở các độ chuẩn OPA trong nhóm huyết thanh 6.

Ví dụ 51

Tính phản ứng chéo của kiểu huyết thanh 20A và 20B – nghiên cứu hóa trị một

Sản phẩm thuốc hóa trị một được bào chế bằng cách sử dụng thể liên hợp polysacarit phế cầu khuẩn 20A-CRM197 và được phối trộn trong 20mM histidin độ

pH = 5,8 và natri clorua 150mM và Polysorbat-20 (PS-20) 0,2% trọng lượng/thể tích ở 4,0µg/mL. Dạng phối trộn này được tạo ra với 250,0µg [Al]/mL dưới dạng nhôm phosphat làm chất phụ trợ (20A-CRM197/APA). Thở liên hợp được tạo ra bằng cách liên hợp riêng rẽ protein CRM197 với polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) kiểu 20. Thở tích của thở liên hợp khối cần phải có để thu được nồng độ mục tiêu của từng kiểu huyết thanh riêng rẽ được tính dựa trên thở tích mẻ và nồng độ của từng nồng độ polysacarit khối riêng rẽ. Thở liên hợp đơn lẻ được bổ sung vào dung dịch chứa histidin, natri clorua và PS-20 để tạo ra hỗn hợp liên hợp 4X ovr 16,0µg/mL. Bình phối trộn chứa hỗn hợp liên hợp này được trộn bằng cách sử dụng que khuấy từ và được lọc vô trùng vào một bình khác. Hỗn hợp 4X đã được lọc vô trùng sau đó được bổ sung vào một bình khác chứa chất phụ trợ nhôm phosphat để đạt được tổng nồng độ polysacarit, tá dược và chất phụ trợ mục tiêu mong muốn. Sau đó các dạng phối trộn được làm đầy vào các lọ thủy tinh và được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Thở được tạo miễn dịch bằng 20A-CRM197/APA hoặc PCV21 để đánh giá tính phản ứng chéo trong nhóm huyết thanh 20. Thở trắng trưởng thành New Zealand (NZWR, n=3/nhóm) được tạo miễn dịch trong cơ (IM) bằng vacxin liên hợp phế cầu khuẩn vào ngày 0 và ngày 14 (đôi bên). Vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị một, được phối trộn như được mô tả ở trên, được định liều ở 1µg PnPs trong 0,25ml (ST20A được liên hợp với CRM197 và 62,5µg [Al] dưới dạng nhôm phosphat được sử dụng làm chất phụ trợ), vacxin liên hợp phế cầu khuẩn đa hóa trị PCV21 (84µg/mL PnPs), được phối trộn trong L-histidin 20mM độ pH = 5,8 NaCl 150mM và PS-20 0,2% (trọng lượng/thể tích) với quy trình phối trộn được mô tả trong ví dụ 38, được định liều ở 0,4µg PnPs trong 0,1ml (các kiểu huyết thanh 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F và 35B, mỗi kiểu được liên hợp với CRM197). Huyết thanh được gom trước khi nghiên cứu bắt đầu (tiền miễn dịch) và vào ngày 14 (sau liều 1, PD1) và 28 (sau liều 2, PD2). NZWR được quan sát về bất kỳ dấu hiệu ốm yếu hoặc kiệt sức nào ít nhất là hằng ngày bởi đội ngũ chăm sóc động vật đã được đào tạo. Dạng phối trộn vacxin trong NZWR có vẻ là an toàn và được dung nạp tốt, do không có sự kiện có hại liên quan đến vacxin nào được ghi lại. Tất cả các thí nghiệm ở động vật được

...

thực hiện nghiêm ngặt theo các khuyến cáo trong Hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của các Viện Y tế Quốc gia. Phương pháp thí nghiệm NZWR được phê duyệt bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật ở cả Merck & Co., Inc và Covance (Denver, PA).

Huyết thanh NZWR được thử nghiệm trong thử nghiệm thực bào bởi opsonin (OPA) để đánh giá kháng thể chức năng dựa trên các phương pháp được mô tả từ trước ở www.vaccine.uab.edu và phần mềm Opsotiter® 3 được sở hữu và cấp phép từ tổ chức nghiên cứu UAB (xem, Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 và Burton R.L. and Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Thỏ được tạo miễn dịch bằng cả vacxin 20A-CRM197/APA hóa trị một và vacxin PCV21 đa hóa trị tạo ra kháng thể chức năng tiêu diệt cả kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 20A và 20B (Fig.39). Điều này đề xuất rằng kiểu huyết thanh 20A và 20B chia sẻ tính tương tự cấu trúc, dẫn đến tính phản ứng chéo trong nhóm huyết thanh.

- - -

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 21 thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae* riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, và trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm bao gồm:

- I) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A;
- II) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B;
- III) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A; và
- IV) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B;

trong đó chế phẩm này không chứa thể liên hợp polysacarit protein mang chứa các polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bất kỳ khác.

2. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong các thể liên hợp polysacarit protein mang được tạo ra nhờ phản ứng liên hợp bao gồm dung môi aprotic.

3. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 1 hoặc 2, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp polysacarit protein mang được tạo ra nhờ phản ứng liên hợp bao gồm dung môi aprotic.

4. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 2 hoặc 3, trong đó dung môi aprotic là dimetylsulfoxit (DMSO).

5. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó protein mang được chọn từ nhóm bao gồm phức protein màng ngoài (OMPC), toxoit uốn ván, toxoit bạch hầu, protein D và CRM197.

6. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó protein mang là CRM197.
7. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chế phẩm này còn chứa chất phụ trợ.
8. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chế phẩm này không chứa chất phụ trợ.
9. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 21 thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae* riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* là 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A và protein mang là CRM197, và trong đó chế phẩm này không chứa thể liên hợp polysacarit protein mang chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bất kỳ khác.
10. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 9, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp polysacarit protein mang được tạo ra nhờ phản ứng liên hợp bao gồm dung môi aprotic, trong đó dung môi aprotic này là dimetylsulfoxit (DMSO).
11. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 9, trong đó chế phẩm này không chứa chất phụ trợ.
12. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 21 thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae* riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* là 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B, và protein mang là CRM197, và trong đó chế phẩm này không chứa thể liên hợp polysacarit protein mang chứa các polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bất kỳ khác.

13. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 12, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp polysacarit protein mang được tạo ra nhờ phản ứng liên hợp bao gồm dung môi aprotic, trong đó dung môi aprotic này là dimetylsulfoxit (DMSO).

14. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 12, trong đó chế phẩm này không chứa chất phụ trợ.

15. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 20 thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* là 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B, và protein mang là CRM197, và trong đó chế phẩm này không chứa thể liên hợp polysacarit protein mang chứa các polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bất kỳ khác.

16. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 15, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp polysacarit protein mang được tạo ra nhờ phản ứng liên hợp bao gồm dung môi aprotic, trong đó dung môi aprotic này là dimetylsulfoxit (DMSO).

17. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 15, trong đó chế phẩm này không chứa chất phụ trợ.

18. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, và trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm bao gồm:

- (1) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (2) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (3) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,

- (4) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (5) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (6) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (7) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (8) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (9) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (10) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (11) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (12) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (13) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (14) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (15) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (16) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 và 35B,
- (17) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (18) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,

- (19) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A,
16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (20) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A,
16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (21) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F,
23F, 24F, 31 và 35B,
- (22) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B,
15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (23) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A,
16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (24) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F,
23F, 24F, 31 và 35B,
- (25) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B,
15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (26) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A,
16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (27) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F,
23F, 24F, 31 và 35B,
- (28) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B,
15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (29) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A,
16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (30) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F,
23F, 24F, 31 và 35B,
- (31) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B,
15A, 16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (32) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A,
16F, 23F, 24F, 31 và 35B,
- (33) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N,
10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B,

- (34) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A,
- (35) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B,
- (36) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B,
- (37) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A,
- (38) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20B,
- (39) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20,
- (40) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20,
- (41) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20, và
- (42) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20,

trong đó chế phẩm này không chứa thể liên hợp polysacarit protein mang chứa các polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bất kỳ khác.

19. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 18, trong đó ít nhất một trong các thể liên hợp polysacarit protein mang được tạo ra nhờ phản ứng liên hợp bao gồm dung môi aprotic.

20. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 18, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp polysacarit protein mang được tạo ra nhờ phản ứng liên hợp bao gồm dung môi aprotic.

21. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 19 hoặc 20, trong đó dung môi aprotic là dimetylsulfoxit (DMSO).

22. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 18, trong đó protein mang được chọn từ nhóm bao gồm phức protein màng ngoài (OMPC), toxoit uốn ván, toxoit bạch hầu, protein D và CRM197.
23. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 22, trong đó protein mang là CRM197.
24. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 23, trong đó chế phẩm này còn chứa chất phụ trợ.
25. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 23, trong đó chế phẩm này không chứa chất phụ trợ.
26. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 25, trong đó polysacarit kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 15C là polysacarit kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 15B được khử O-axetyl.
27. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo các điểm từ 1 đến 8, trong đó polysacarit kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 15C là polysacarit kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 15B được khử O-axetyl.
28. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó polysacarit kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 15C là polysacarit kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 15B được khử O-axetyl.
29. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 26, trong đó polysacarit 15B được khử O-axetyl có hàm lượng O-axetyl trong mỗi đơn vị lặp nhỏ hơn 5%.
30. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 27, trong đó polysacarit 15B được khử O-axetyl có hàm lượng O-axetyl trong mỗi đơn vị lặp nhỏ hơn 5%.
31. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 28, trong đó polysacarit 15B được khử O-axetyl có hàm lượng O-axetyl trong mỗi đơn vị lặp nhỏ hơn 5%.
32. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 21 thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae* riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa

polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* là 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B được khử O-axetyl, 17F, và 20A, và protein mang là CRM197, và trong đó chế phẩm này không chứa thể liên hợp polysacarit protein mang chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bất kỳ khác.

33. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 32, trong đó polysacarit 15B được khử O-axetyl có hàm lượng O-axetyl trong mỗi đơn vị lặp nhỏ hơn 5%.

34. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* chủ yếu gồm có 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B được khử O-axetyl, 17F, và 20A, và protein mang là CRM197.

35. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 34, trong đó polysacarit 15B được khử O-axetyl có hàm lượng O-axetyl trong mỗi đơn vị lặp nhỏ hơn 5%.

36. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* chủ yếu gồm có 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A, và protein mang là CRM197.

37. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* chủ yếu gồm có 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20A, và trong đó protein mang là CRM197.

38. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* gồm có 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B được khử O-axetyl, 17F, và 20A, và protein mang là CRM197.

39. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 38, trong đó polysacarit 15B được khử O-axetyl có hàm lượng O-axetyl trong mỗi đơn vị lặp nhỏ hơn 5%.

40. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* gồm có 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20A, và protein mang là CRM197.

41. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* gồm có 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20A, và trong đó protein mang là CRM197.

42. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* chủ yếu gồm có 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B được khử O-axetyl, 17F, và 20, và protein mang là CRM197.

43. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 42, trong đó polysacarit 15B được khử O-axetyl có hàm lượng O-axetyl trong mỗi đơn vị lặp nhỏ hơn 5%.

44. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* chủ yếu gồm có 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20 và protein mang là CRM197.

45. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* chủ yếu gồm có 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20, và trong đó protein mang là CRM197.

46. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* gồm có 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B được khử O-axetyl, 17F, và 20, và protein mang là CRM197.

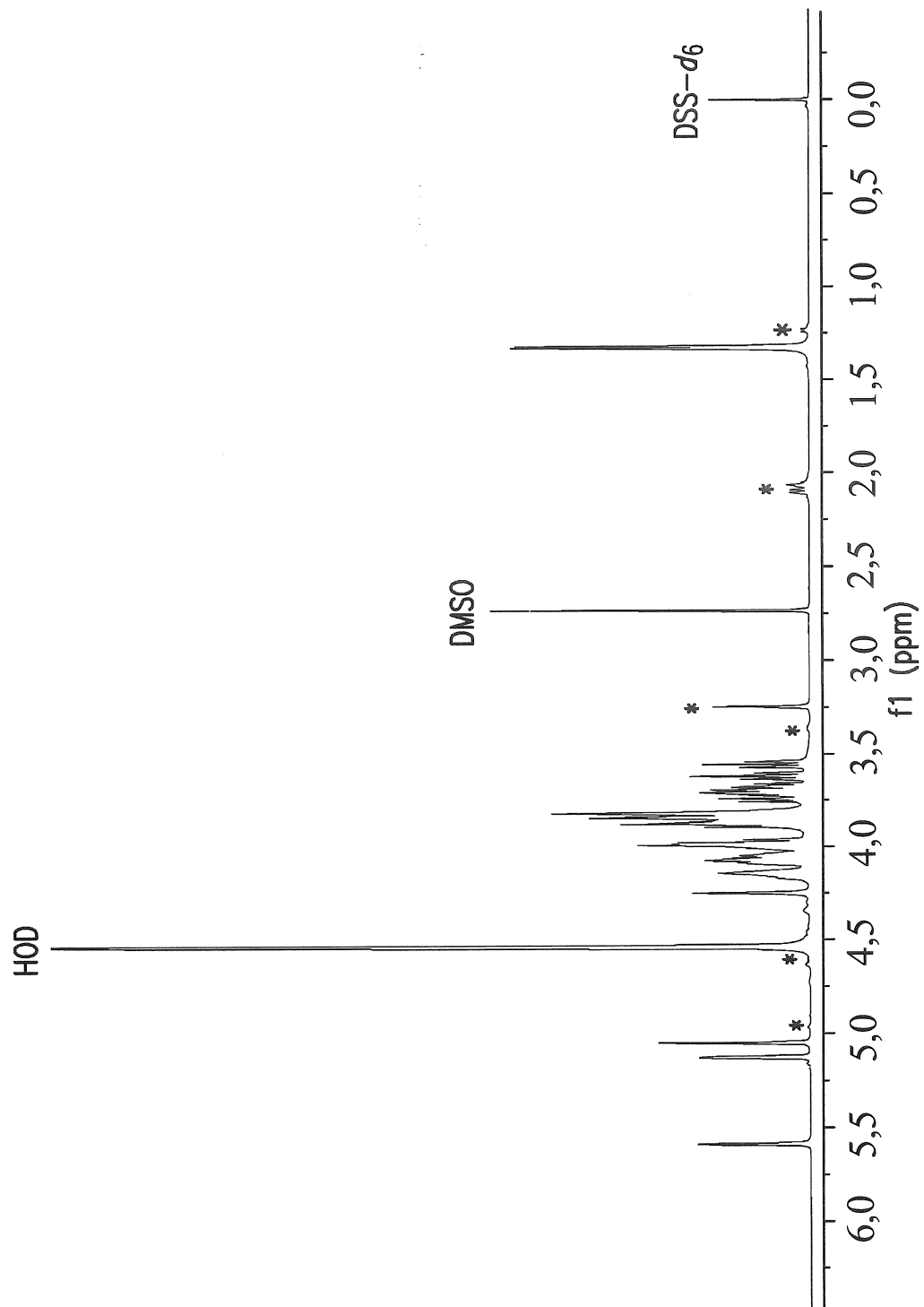
47. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 46, trong đó polysacarit 15B được khử O-axetyl có hàm lượng O-axetyl trong mỗi đơn vị lặp nhỏ hơn 5%.

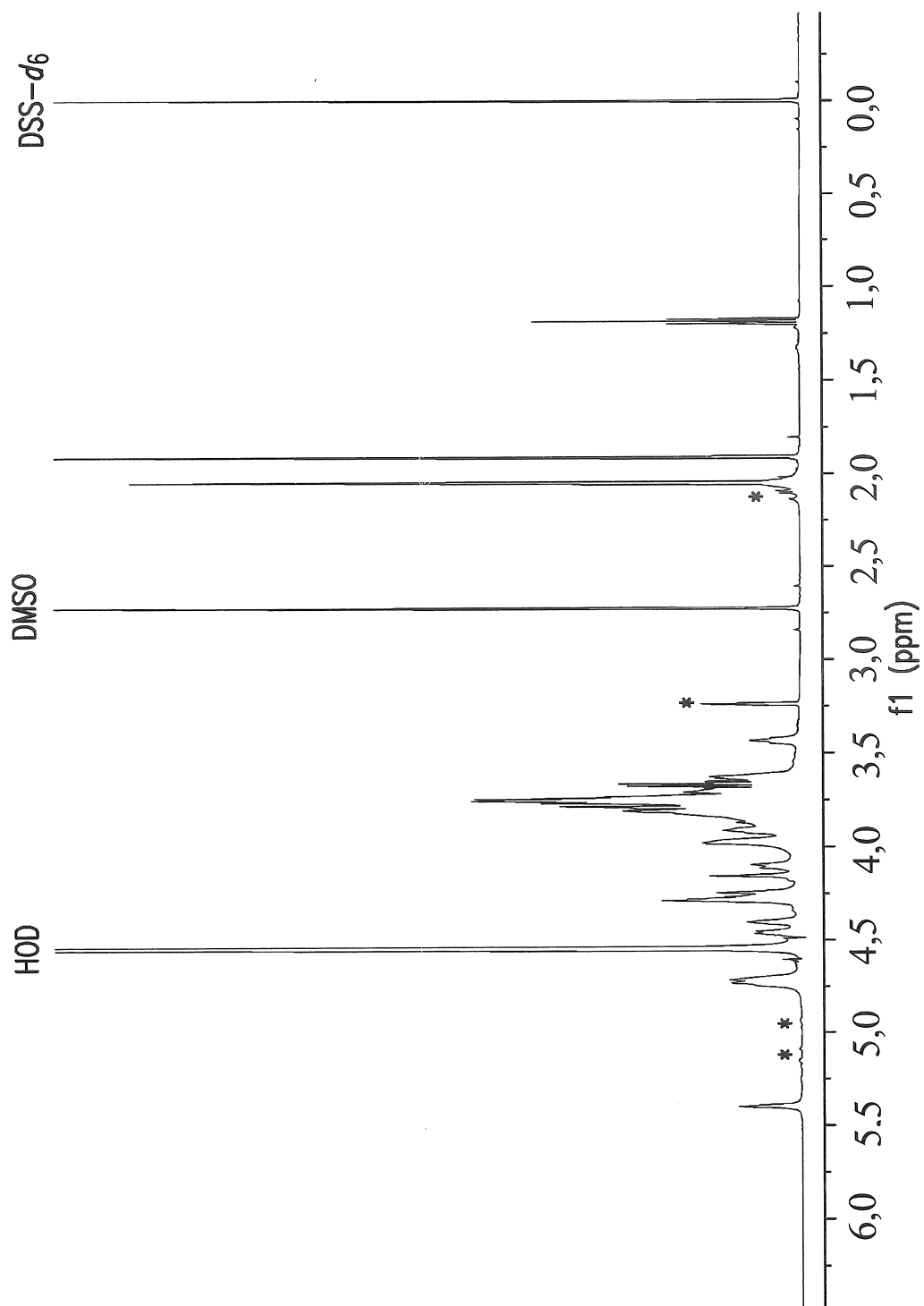
48. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* gồm có 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, và 20 và protein mang là CRM197.

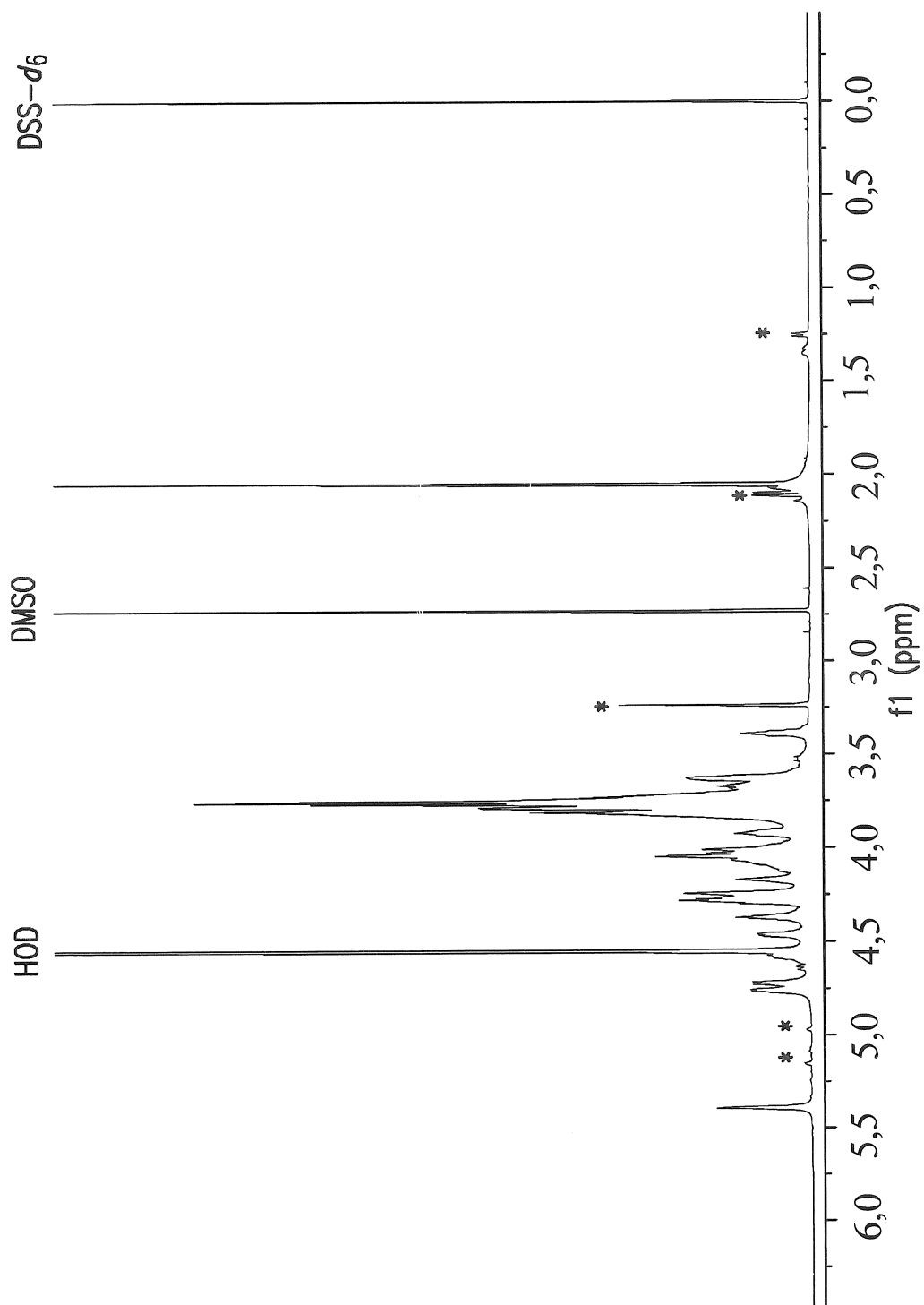
49. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó

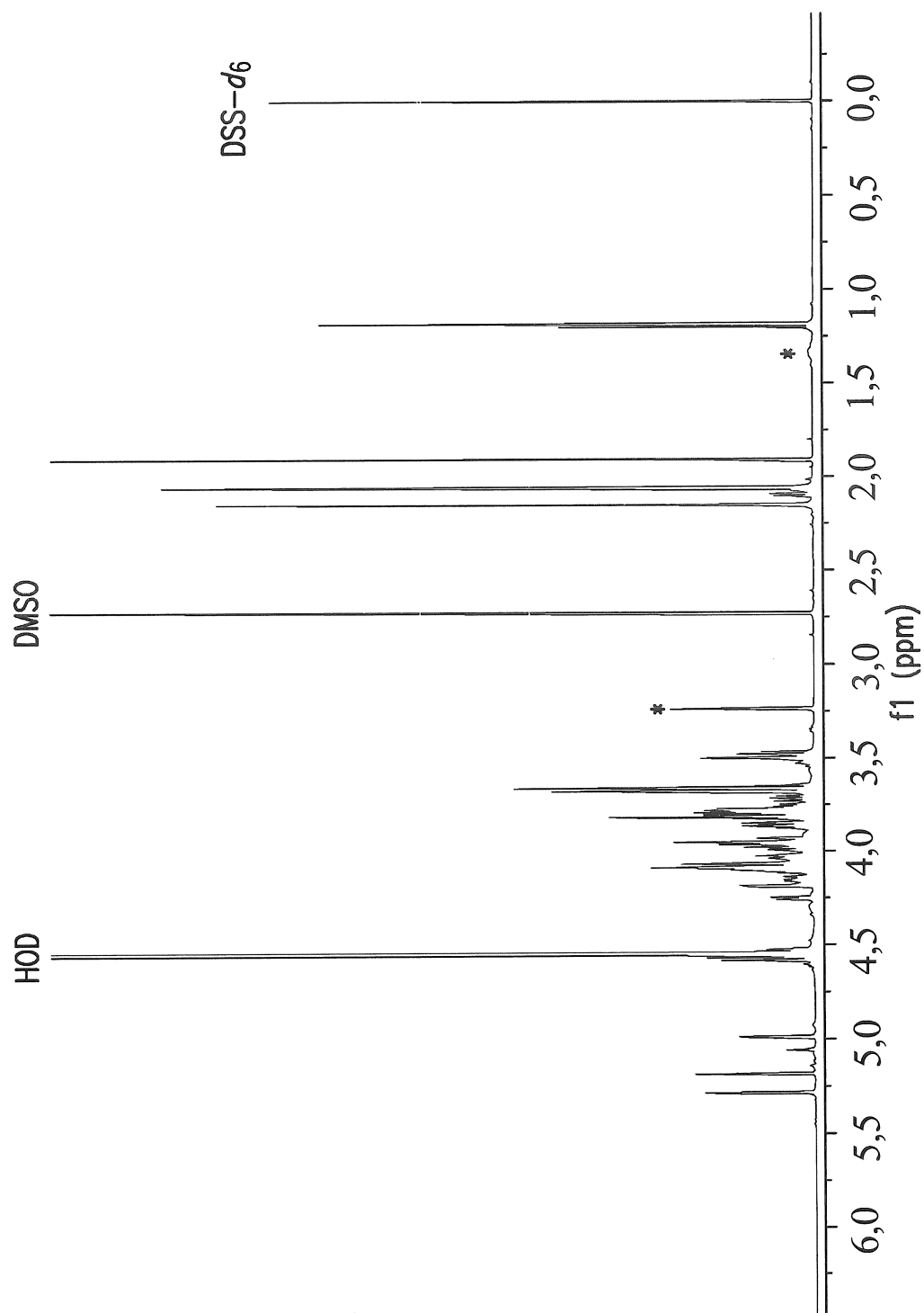
kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* gồm có 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, và 20, và trong đó protein mang là CRM197.

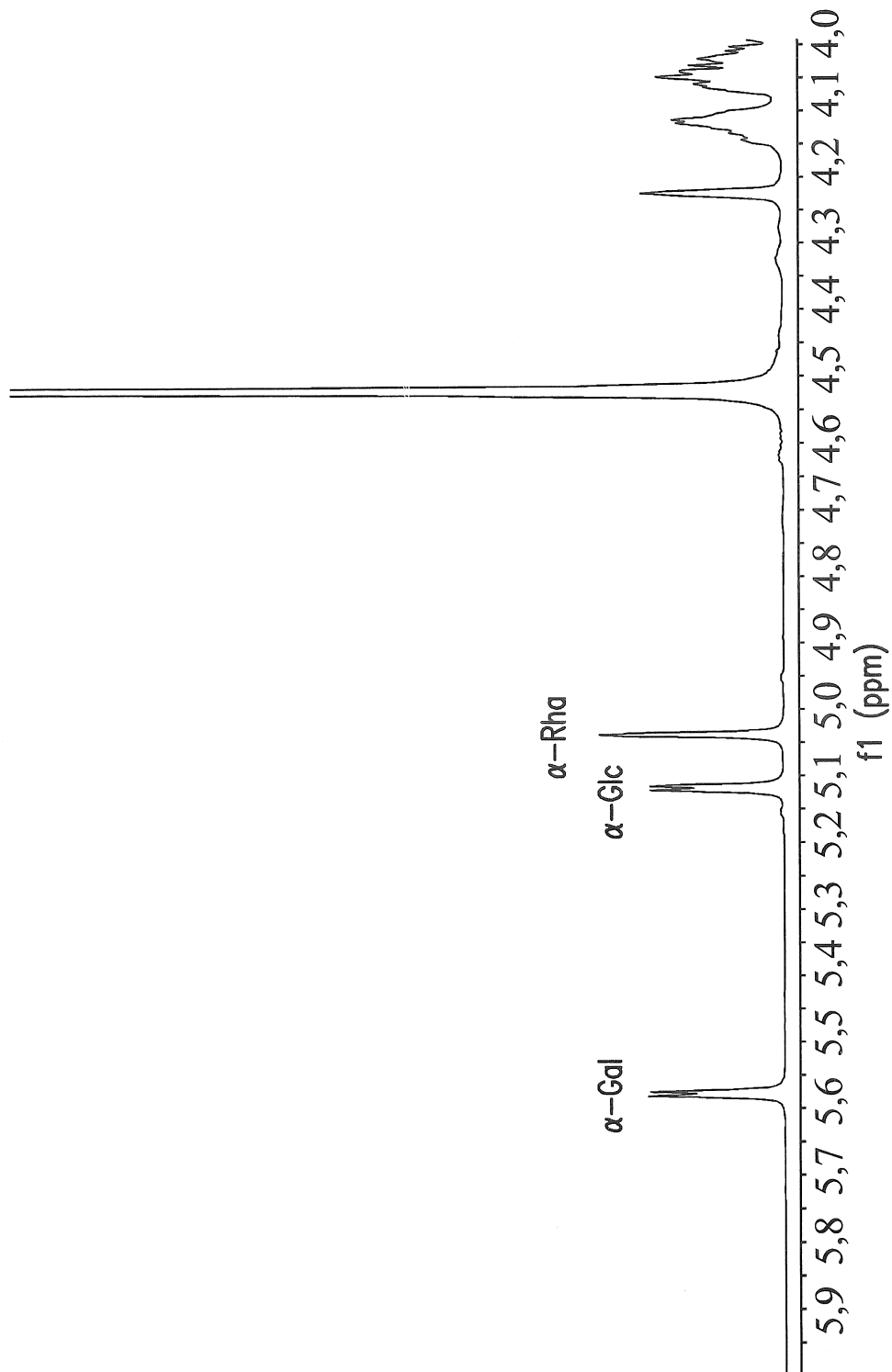
1/52

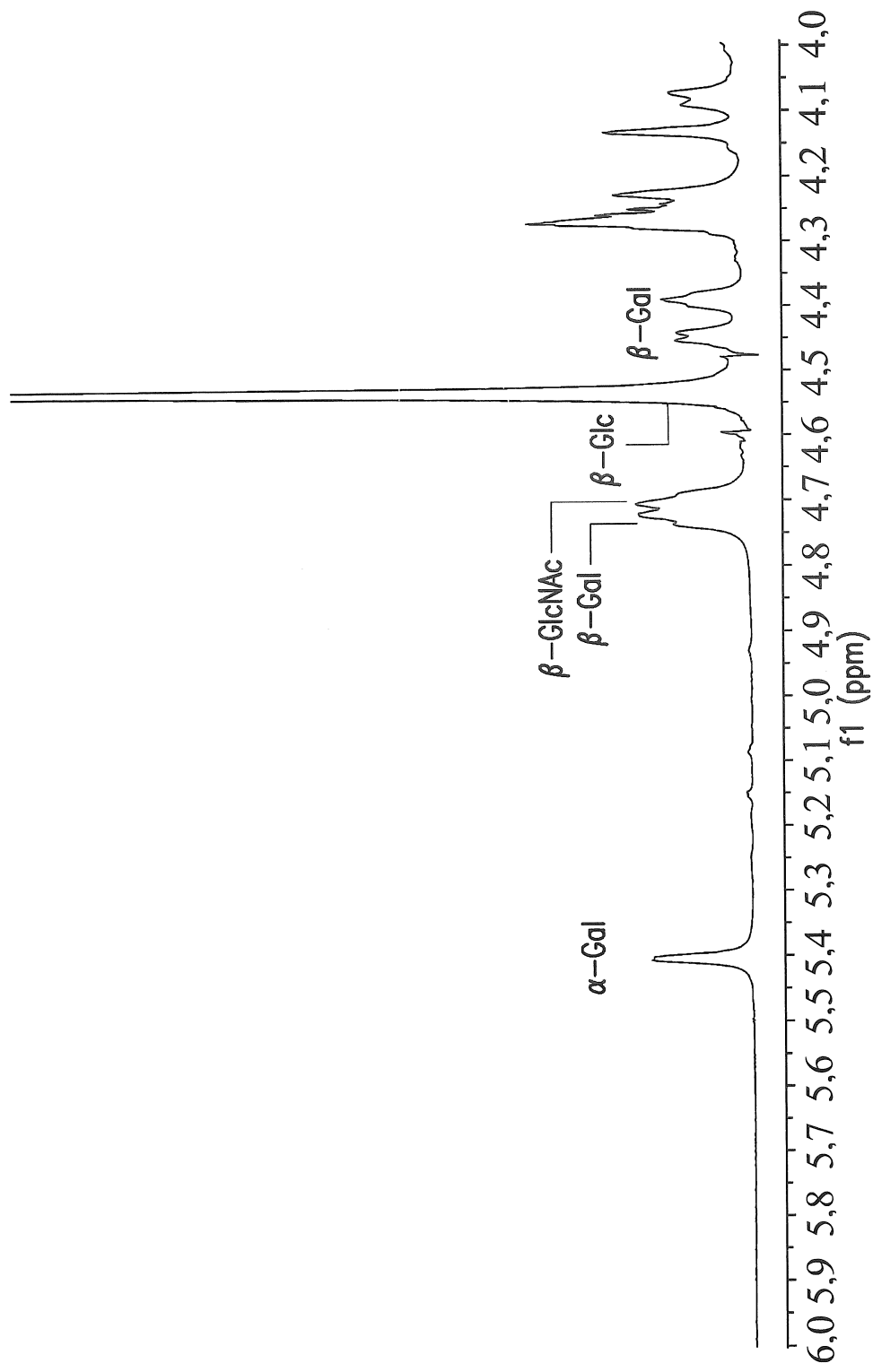
**Fig.1**

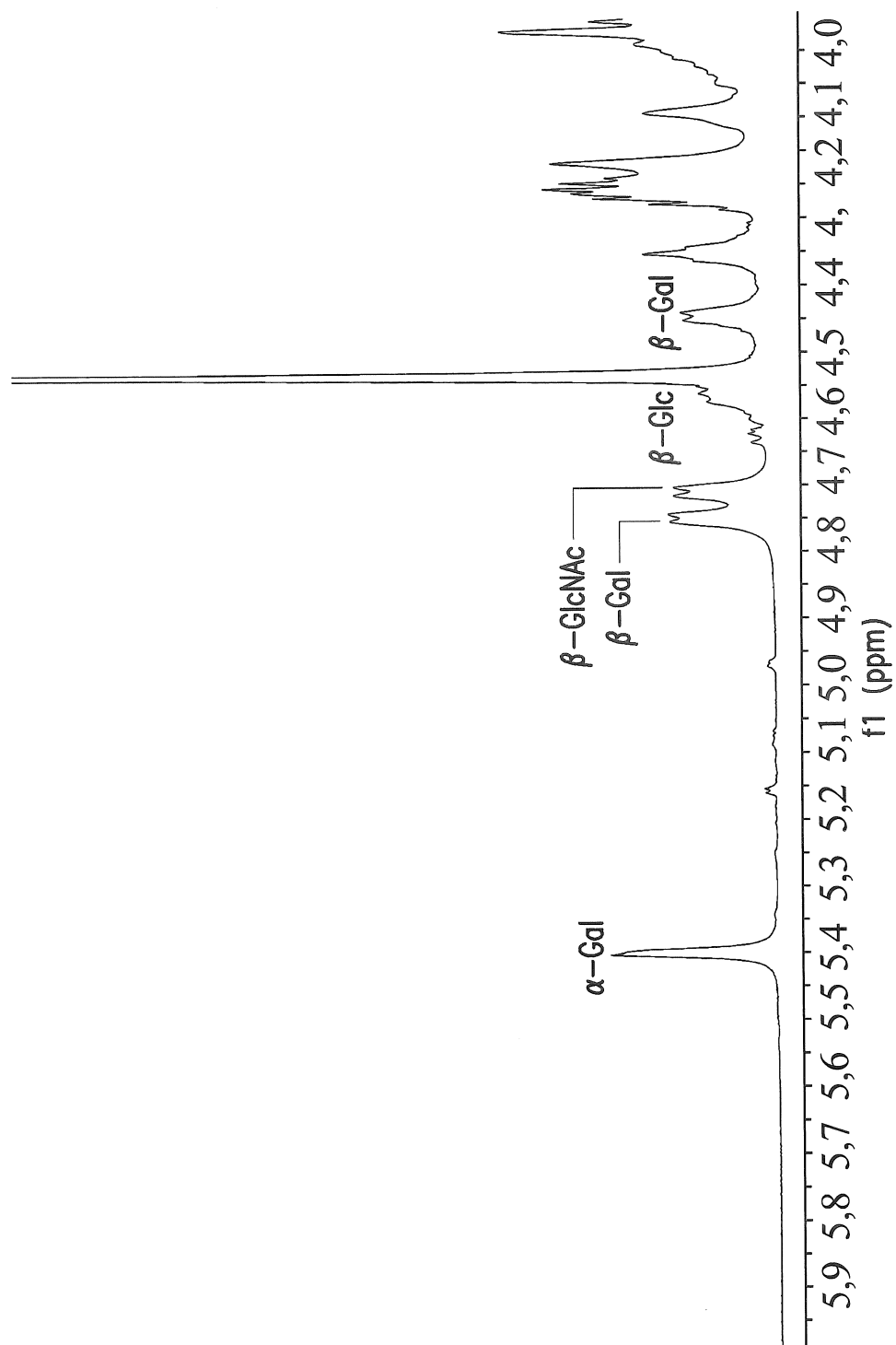
**Fig.2**

**Fig.3**

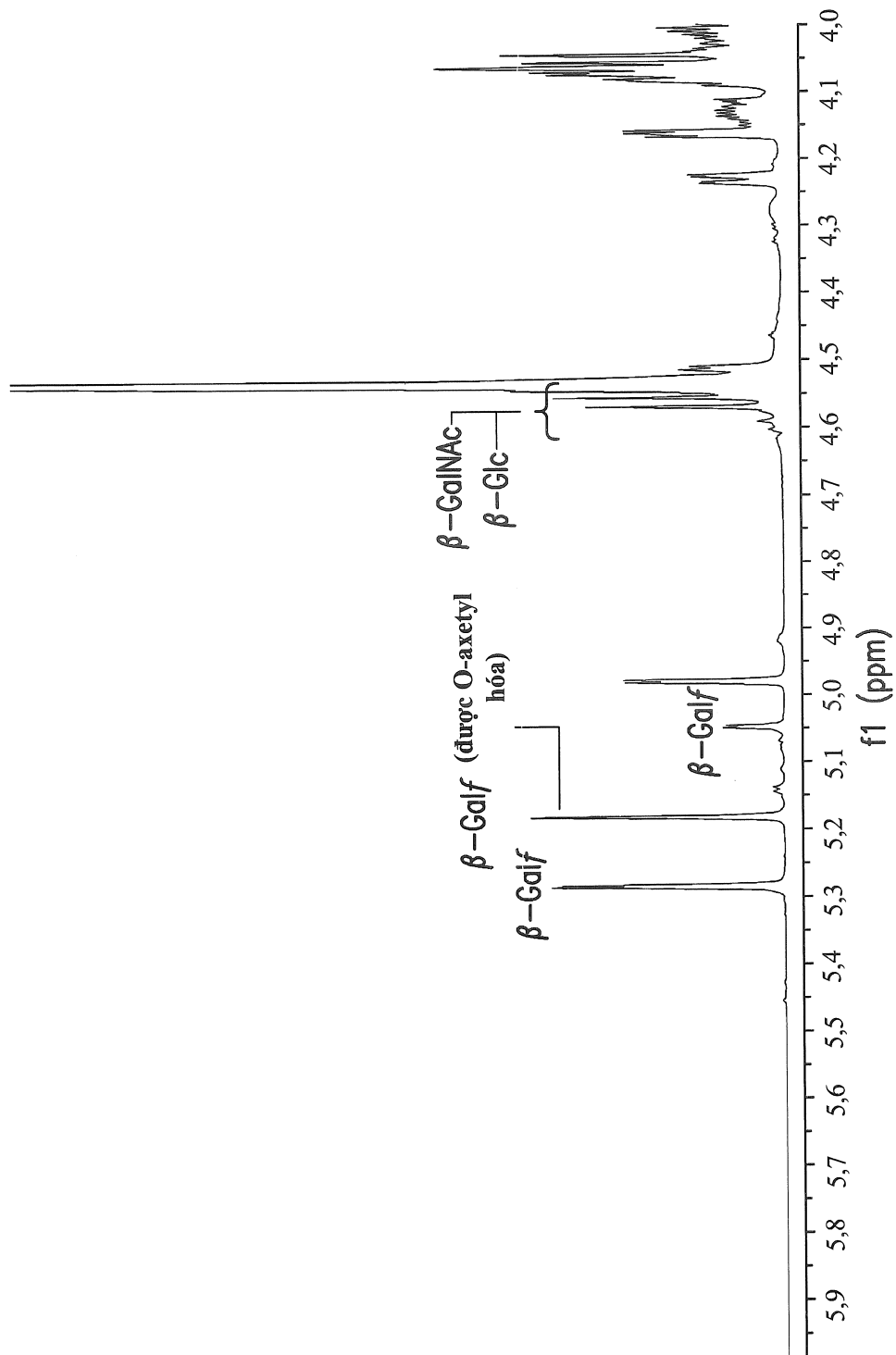
**Fig.4**

**Fig.5**

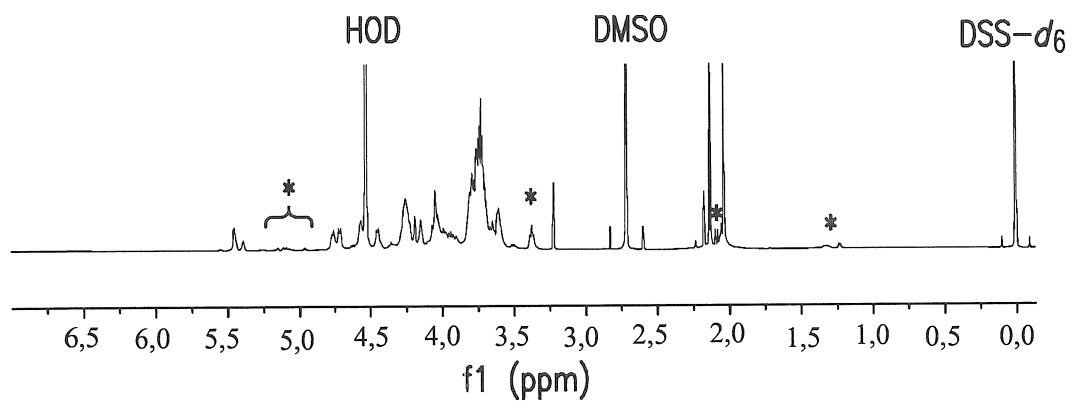
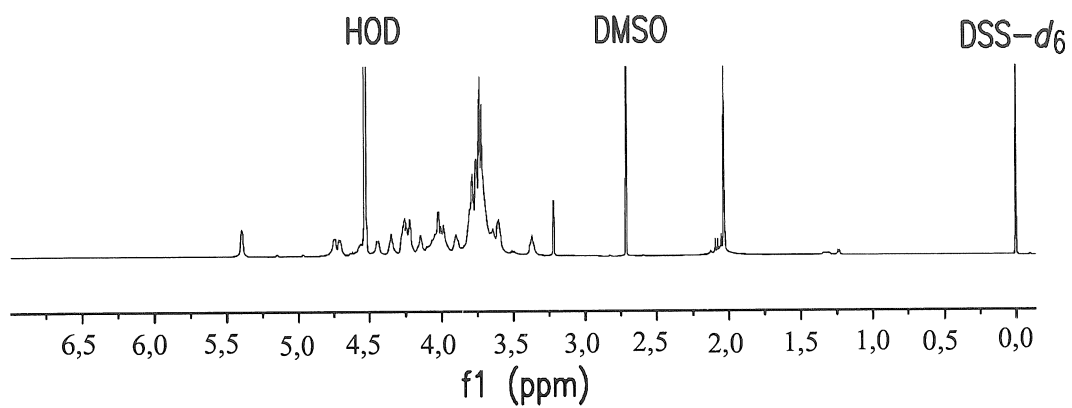
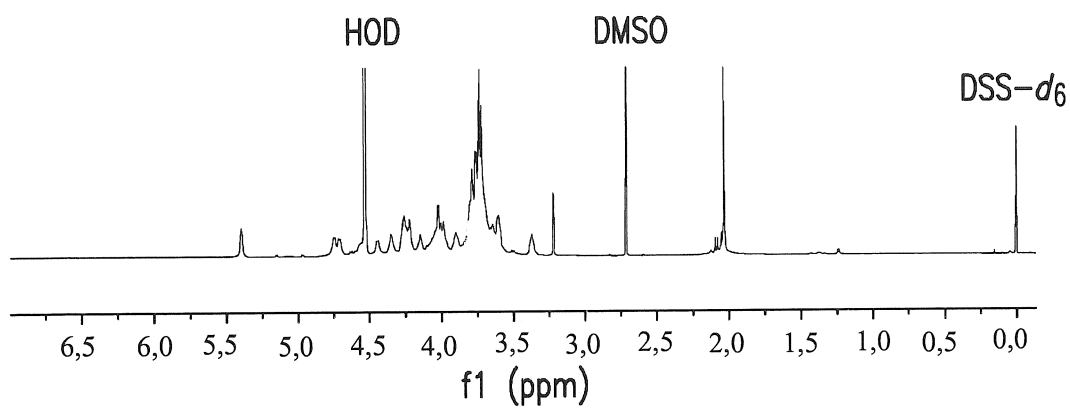
**Fig.6**

**Fig.7**

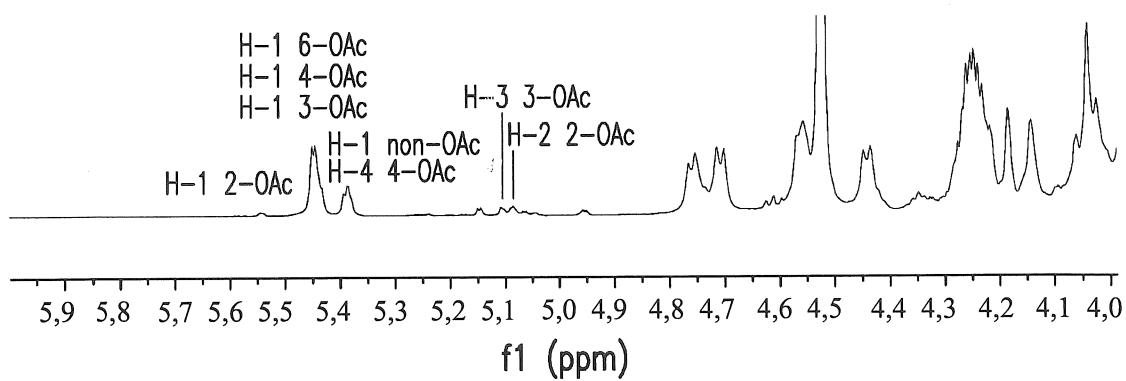
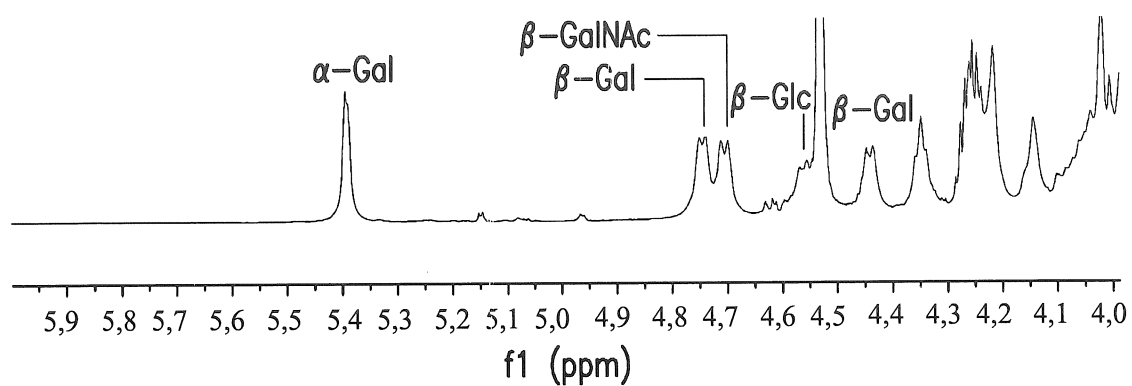
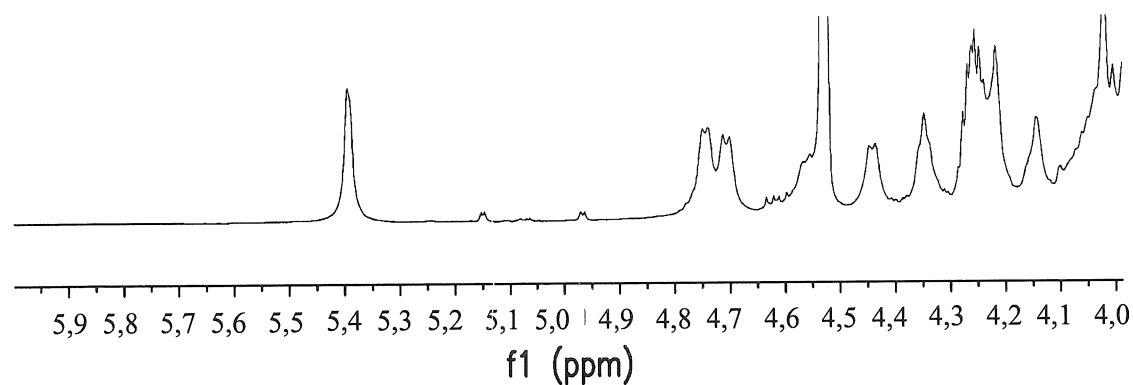
8/52

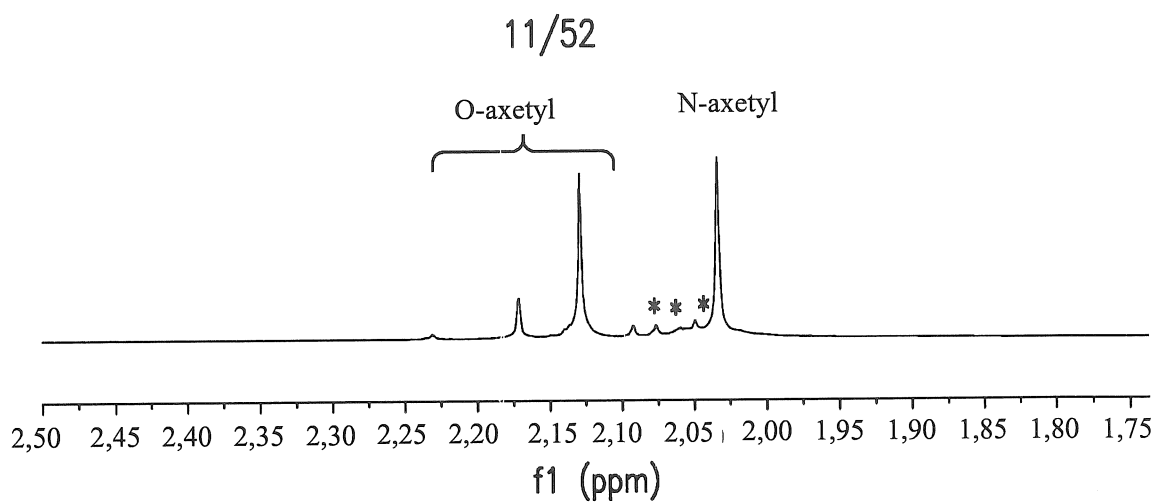
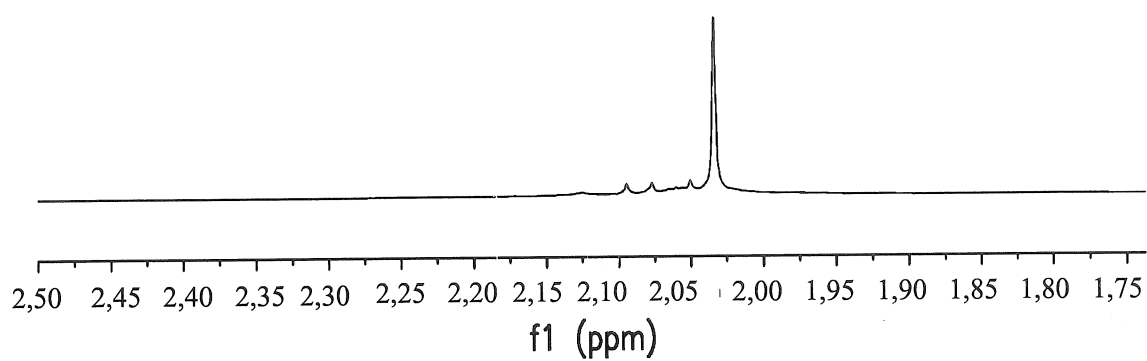
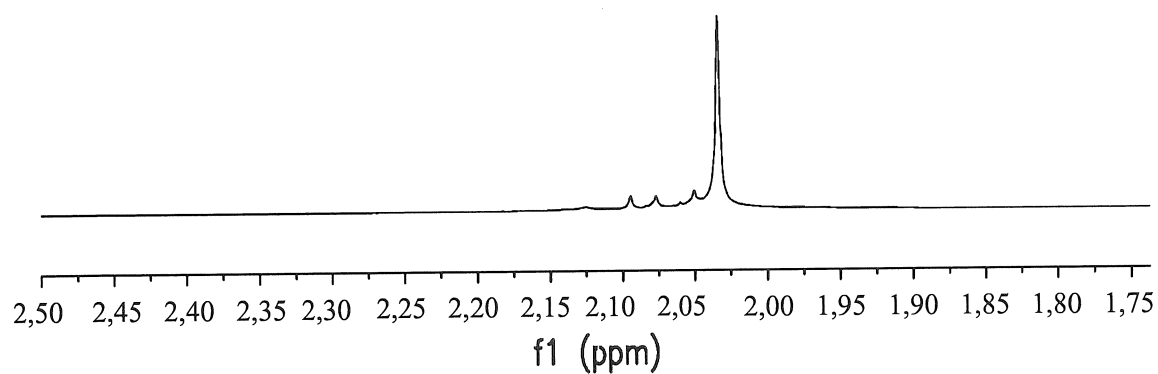
**Fig.8**

9/52

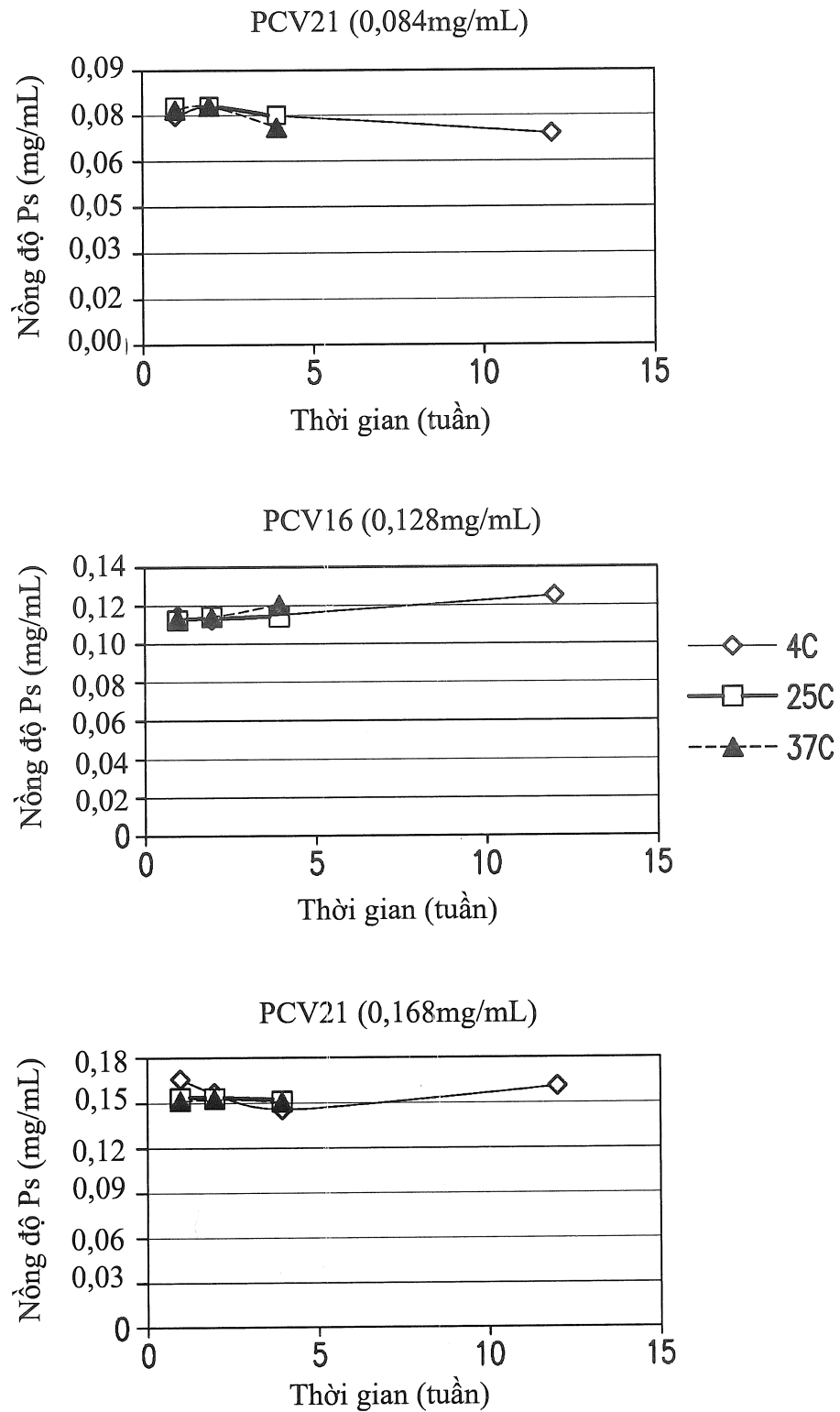
**Fig.9A****Fig.9B****Fig.9C**

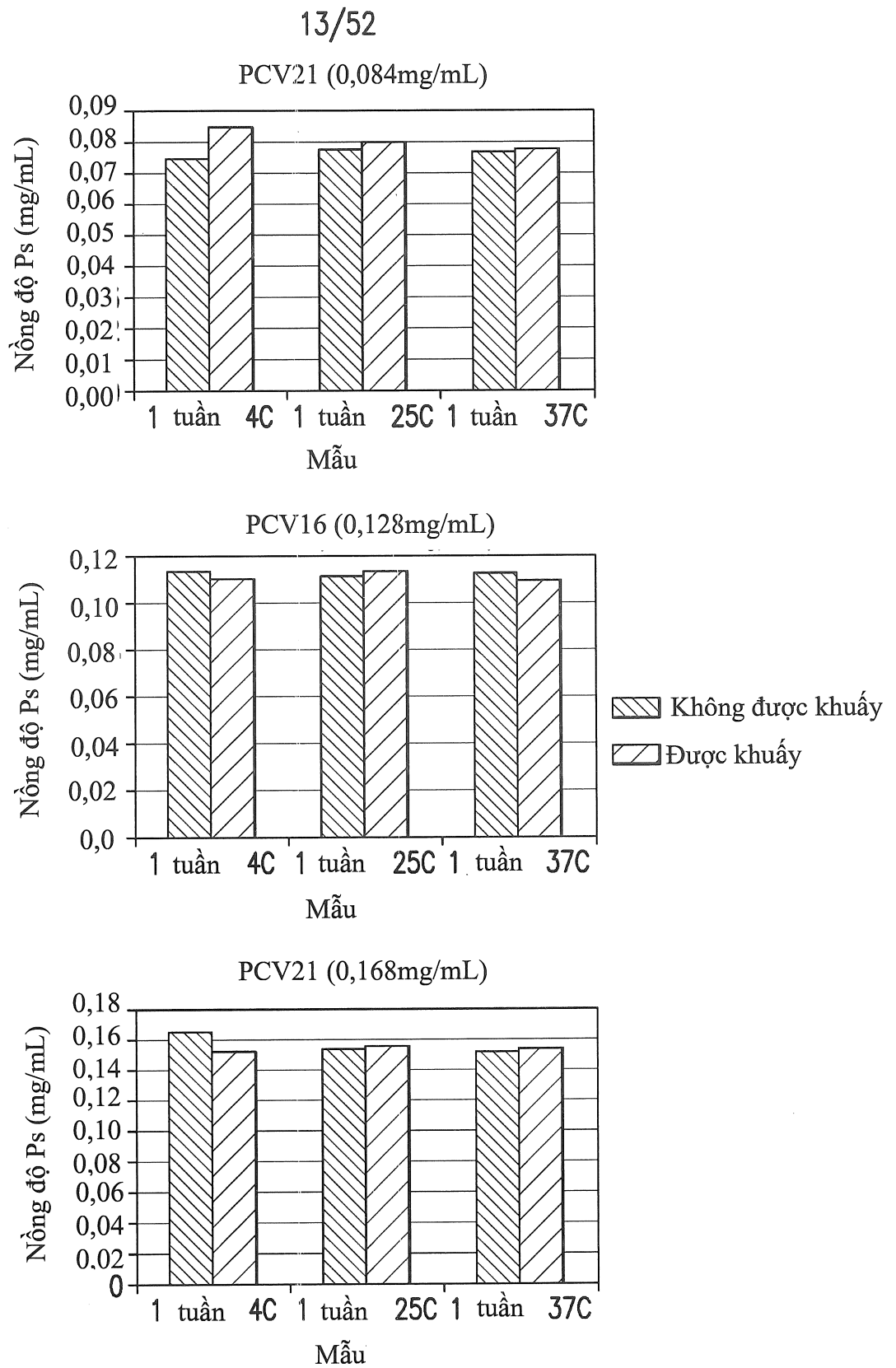
10/52

**Fig.10A****Fig.10B****Fig.10C**

**Fig.10D****Fig.10E****Fig.10F**

12/52

**Fig.11**

**Fig.12**

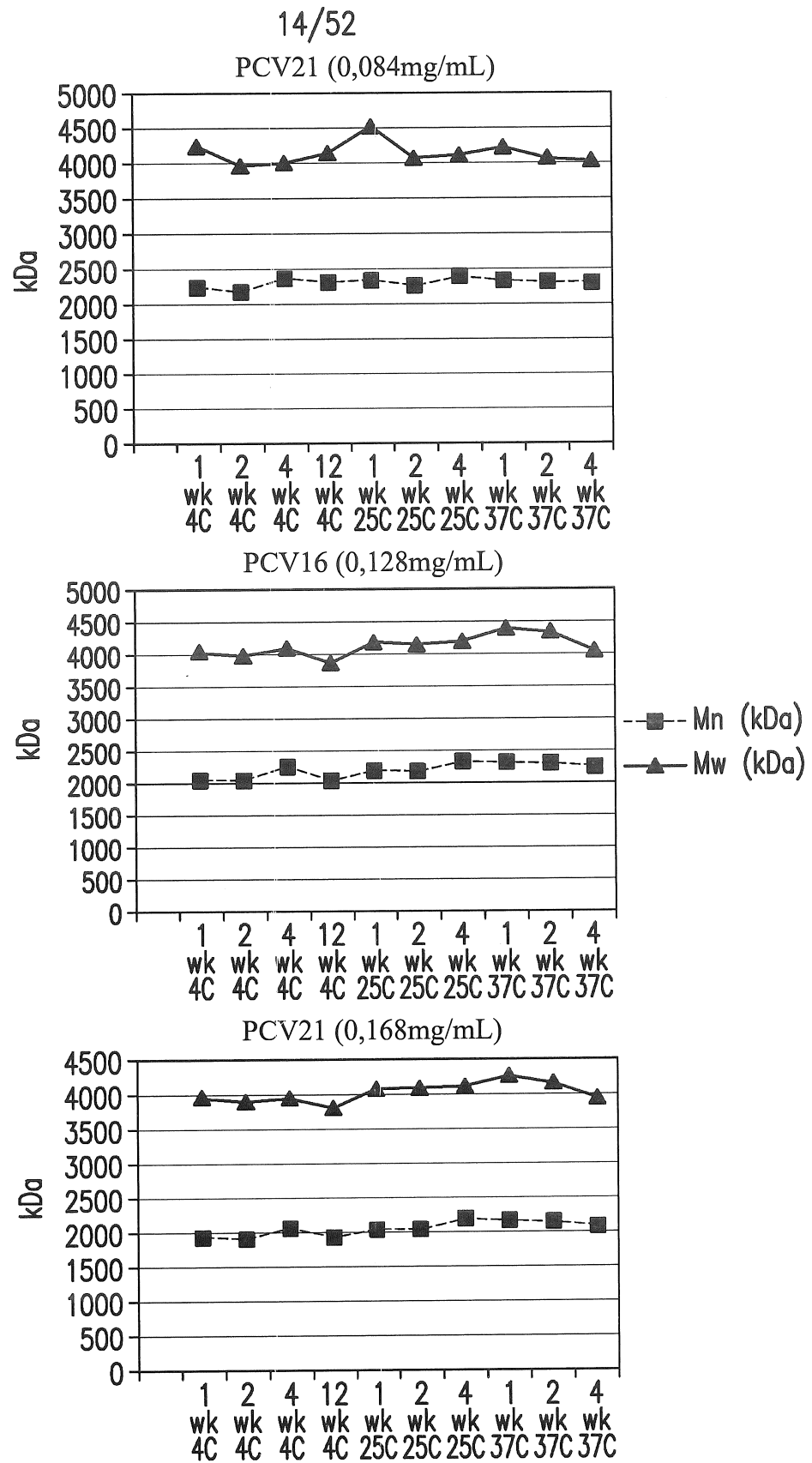
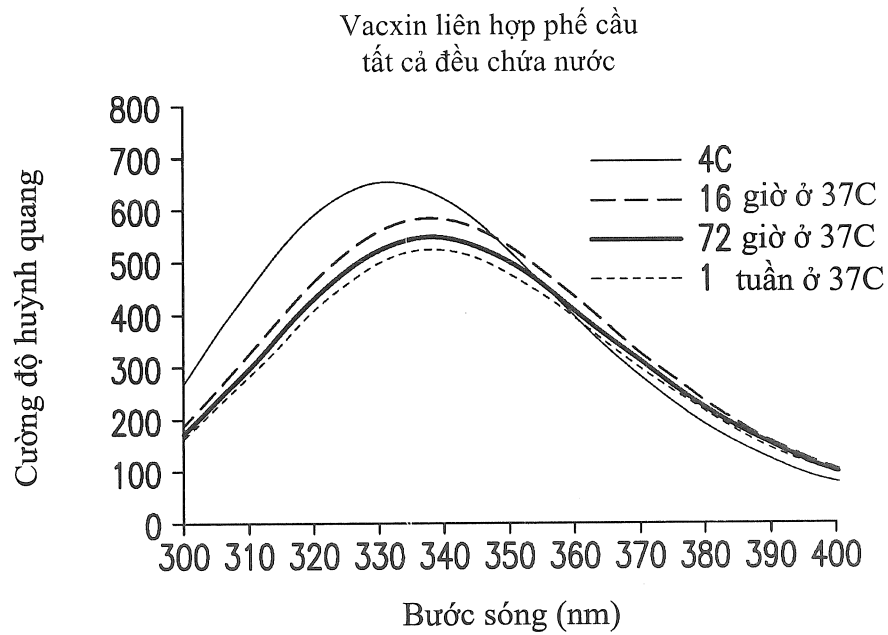
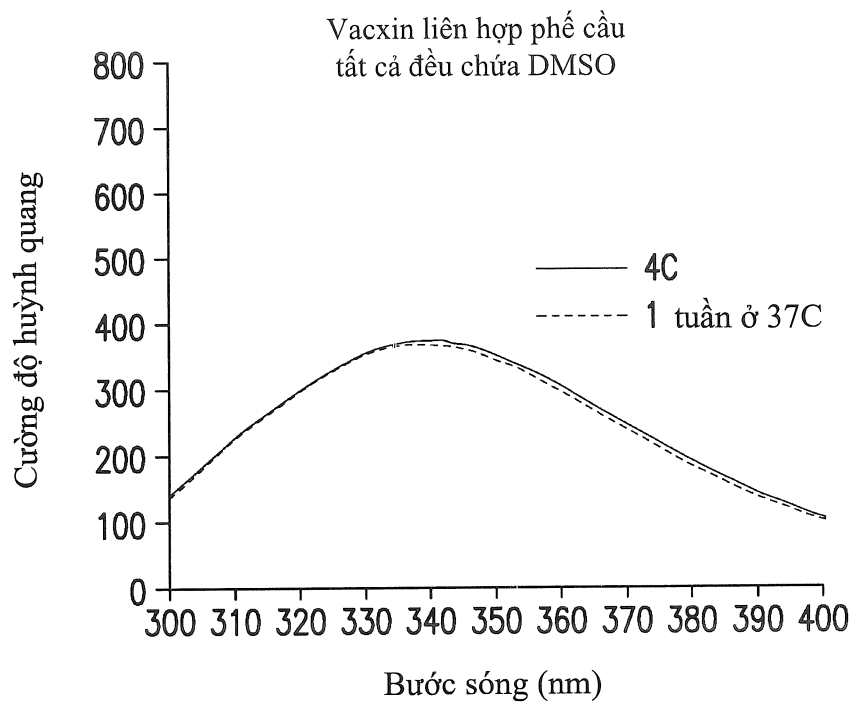


Fig.13

15/52

**Fig.14A****Fig.14B**

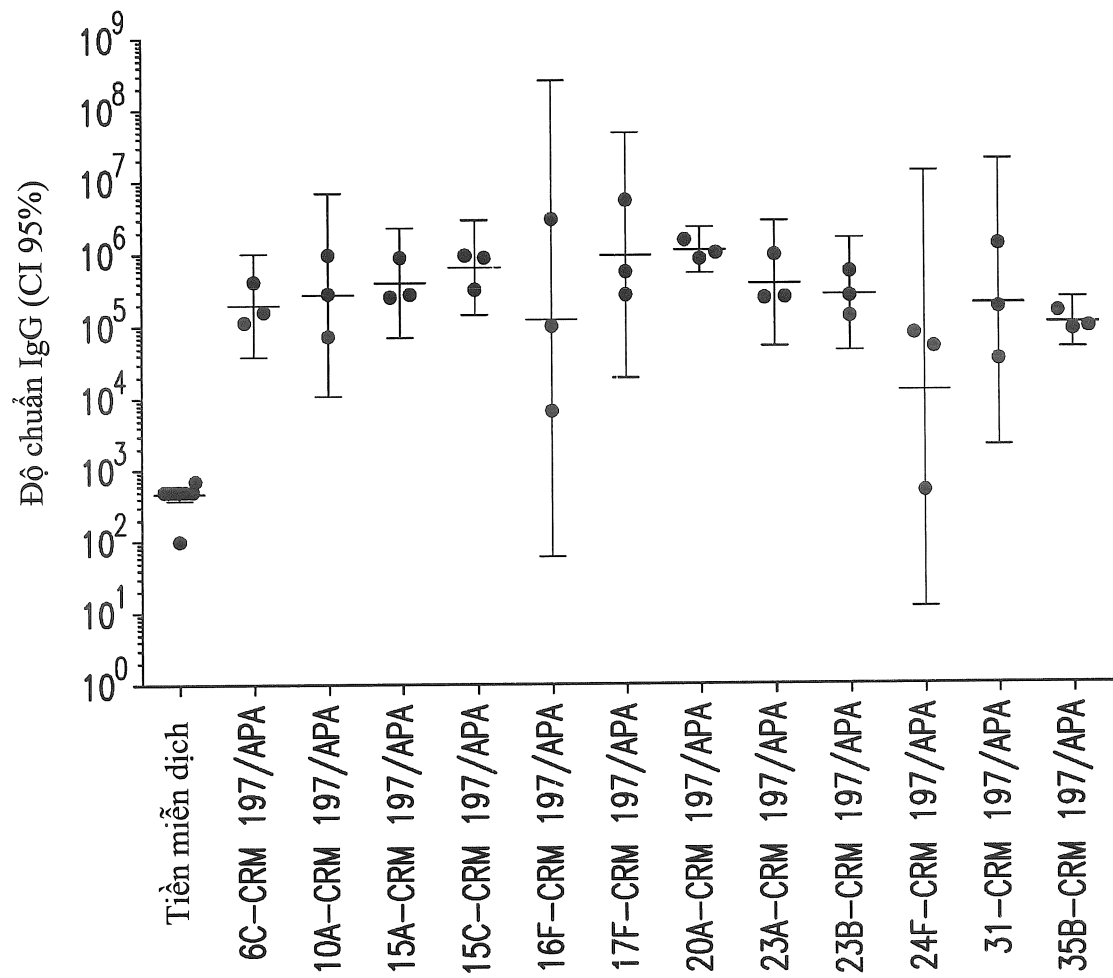


Fig.15

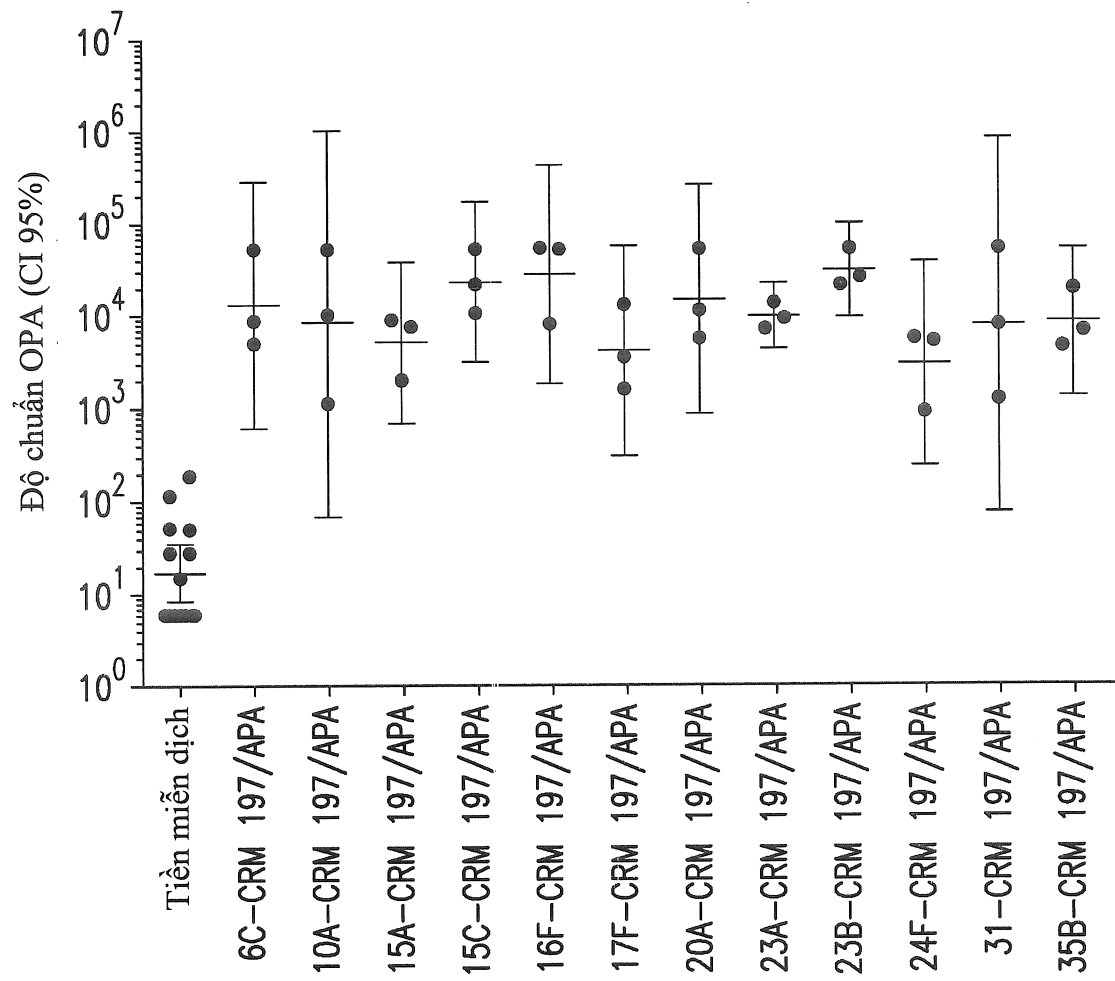


Fig.16

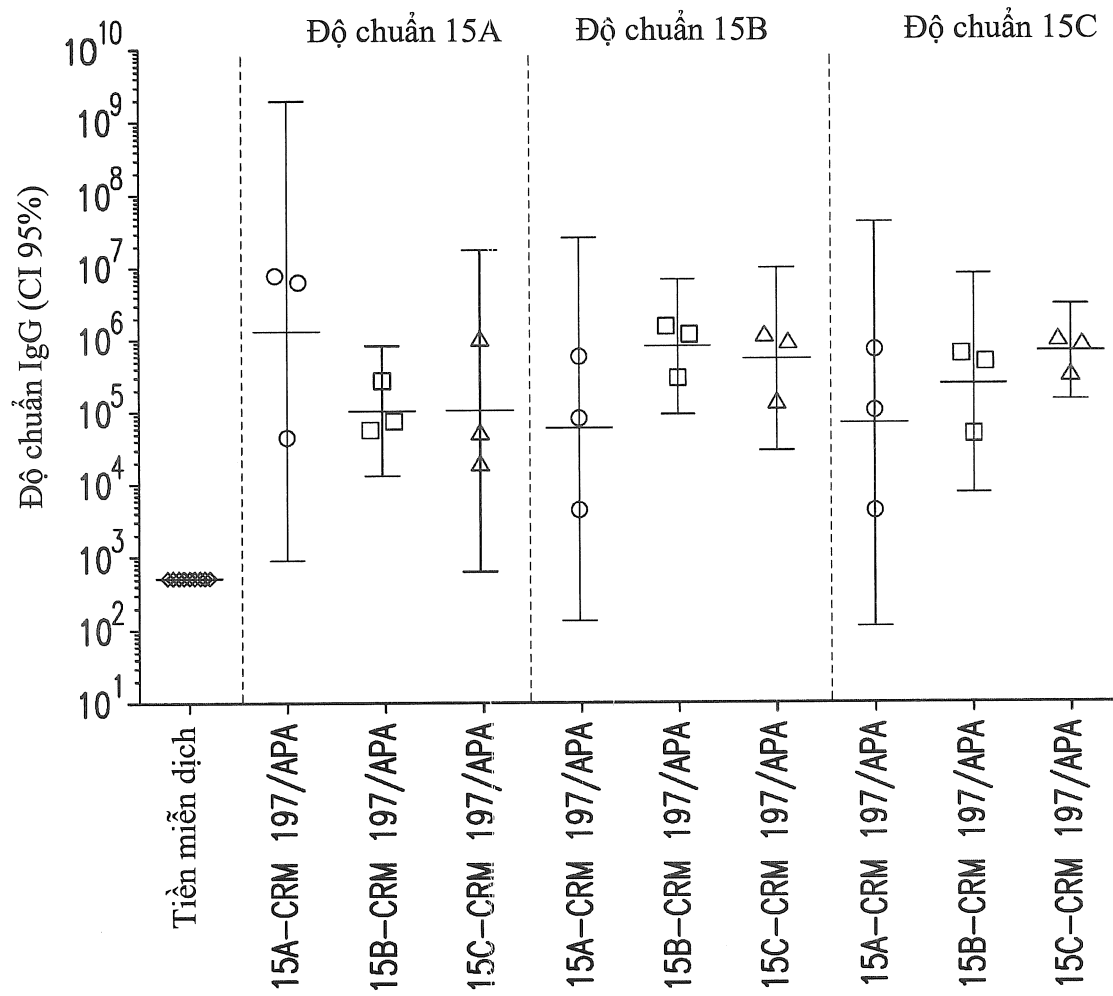


Fig.17

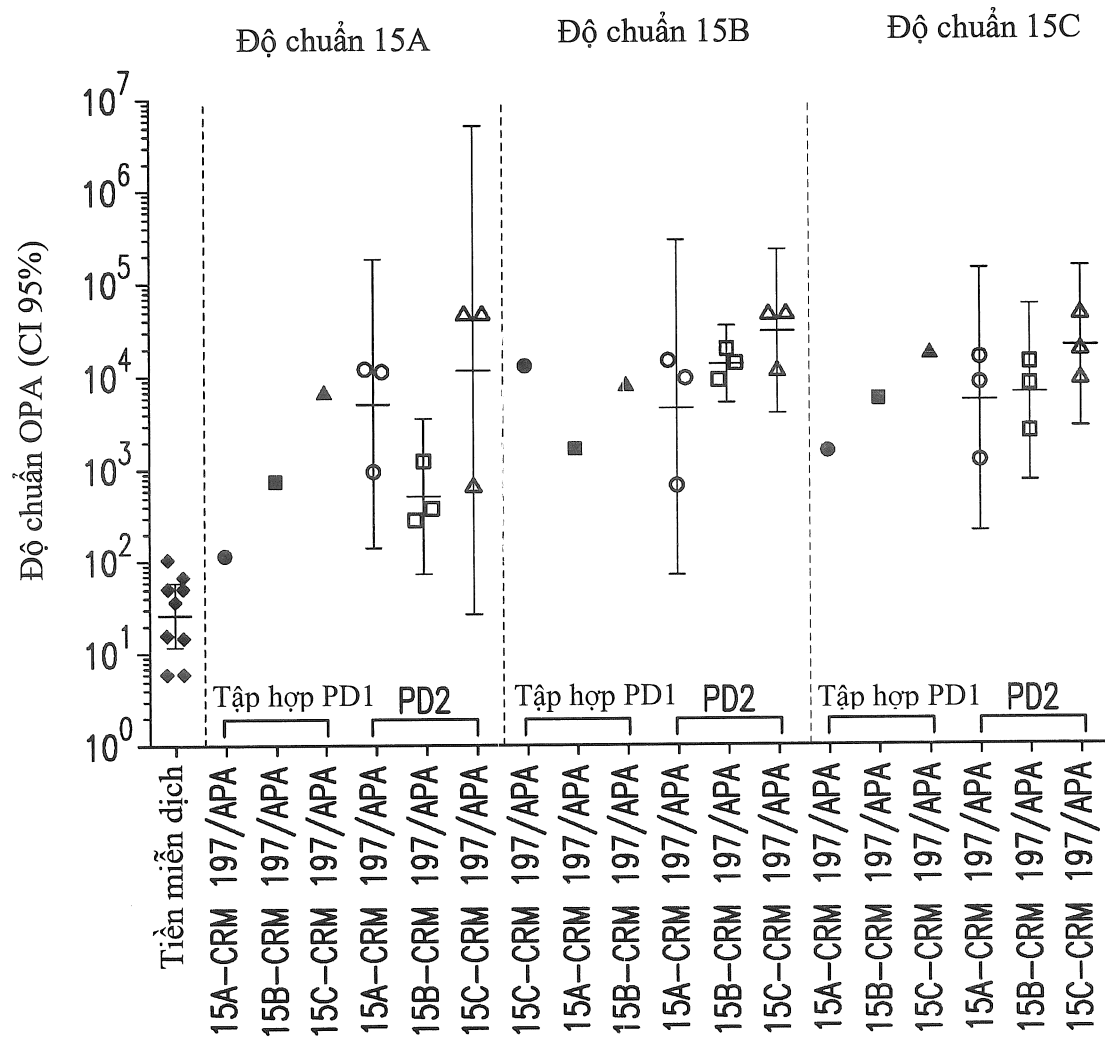


Fig.18

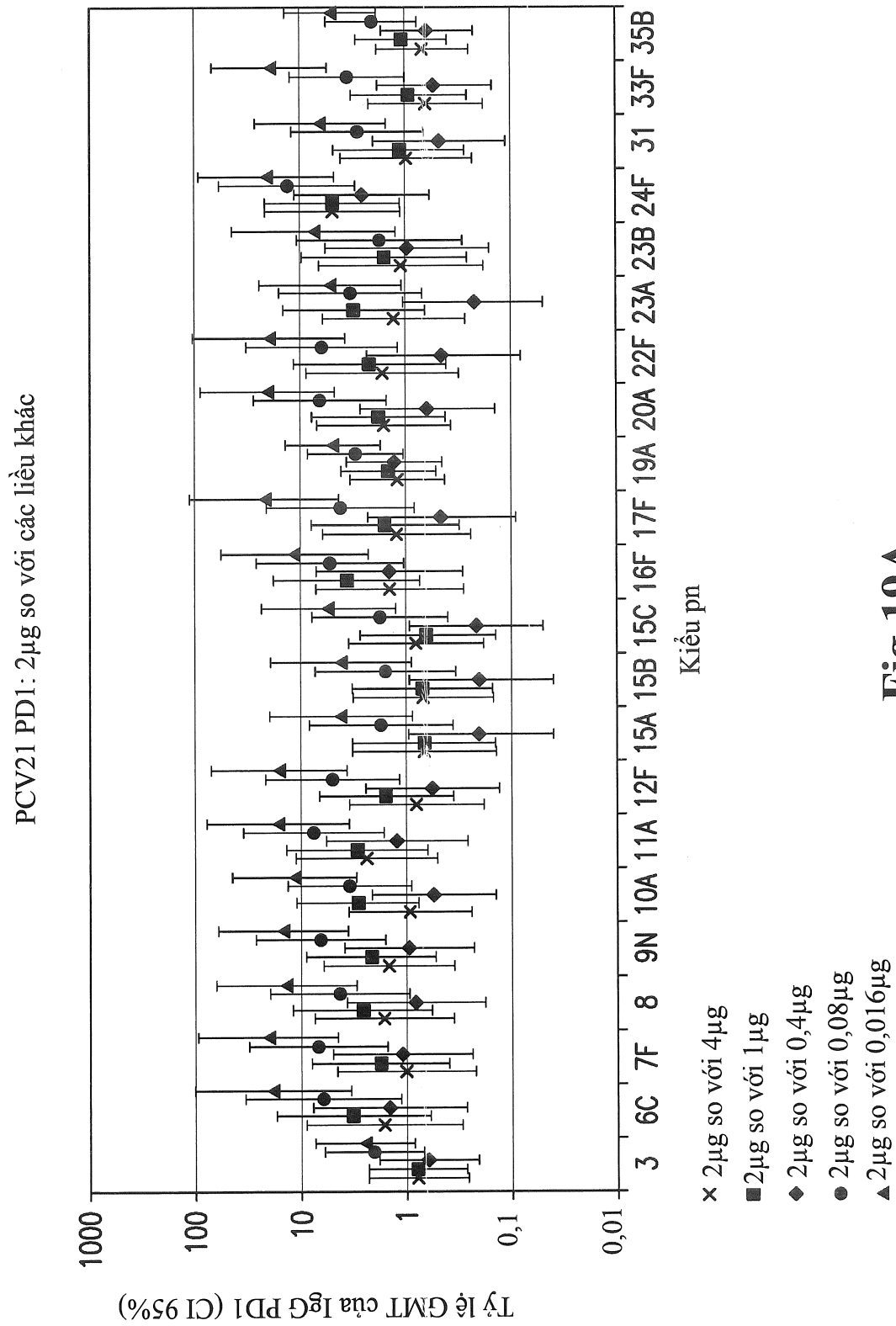


Fig.19A

Kiểu huyết thanh	2 μ g so với 4 μ g	2 μ g so với 1 μ g	2 μ g so với 0,4 μ g	2 μ g so với 0,08 μ g	2 μ g so với 0,016 μ g
3	0,78 (0,26, 2,3)	0,79 (0,27, 2,3)	0,62 (0,21, 1,84)	2,1 (0,7, 6,1)	2,5 (0,85, 7,5)
6C	1,64 (0,3, 8,9)	3,2 (0,6, 18)	1,44 (0,27, 7,8)	6,3 (1,15, 34)	19 (3,5, 102)
7F	1,01 (0,22, 4,6)	1,76 (0,39, 8)	1,11 (0,24, 5,1)	6,9 (1,52, 32)	21 (4,5, 94)
8	1,64 (0,36, 7,5)	2,6 (0,57, 12)	0,81 (0,18, 3,7)	4,3 (0,94, 20)	14 (3, 63)
9N	1,46 (0,35, 6)	2,1 (0,52, 8,9)	0,94 (0,23, 3,9)	6,5 (1,58, 27)	15 (3,5, 60)
10A	0,92 (0,24, 3,5)	2,9 (0,75, 11)	0,55 (0,14, 2,1)	3,5 (0,9, 13)	12 (3, 44)
11A	2,4 (0,51, 11)	2,9 (0,62, 14)	1,21 (0,26, 5,7)	7,5 (1,61, 35)	16 (3,5, 77)
12F	0,79 (0,18, 3,5)	1,54 (0,35, 6,7)	0,55 (0,13, 2,4)	5 (1,14, 22)	16 (3,7, 70)
15A	0,68 (0,14, 3,3)	0,67 (0,14, 3,2)	0,2 (0,041, 0,95)	1,73 (0,36, 8,3)	4,1 (0,86, 20)
15B	0,68 (0,15, 3,1)	0,7 (0,15, 3,3)	0,2 (0,043, 0,93)	1,57 (0,34, 7,3)	4,2 (0,89, 19)
15C	0,81 (0,18, 3,5)	0,63 (0,14, 2,8)	0,21 (0,49, 0,93)	1,77 (0,4, 7,7)	5,4 (1,24, 24)
16F	1,42 (0,28, 7,1)	3,7 (0,73, 18)	1,43 (0,29, 7,2)	5,3 (1,05, 29)	11 (2,3, 57)
17F	1,22 (0,24, 6,2)	1,58 (0,31, 8,1)	0,46 (0,09, 2,3)	4,2 (0,82, 21)	22 (4,3, 112)
19A	1,19 (0,42, 3,4)	1,45 (0,51, 4,1)	1,29 (0,45, 3,7)	3 (1,05, 8,5)	5 (1,74, 14)
20A	1,59 (0,37, 6,9)	1,82 (0,42, 7,9)	0,62 (0,14, 2,7)	6,5 (1,52, 28)	20 (4,7, 88)
22F	1,65 (0,31, 8,8)	2,2 (0,41, 12)	0,45 (0,084, 2,4)	6,2 (1,17, 33)	20 (3,7, 105)
23A	1,27 (0,27, 6)	3,1 (0,65, 15)	0,22 (0,046, 1,04)	3,3 (0,7, 16)	5,1 (1,08, 25)
23B	1,09 (0,18, 6,7)	1,59 (0,26, 9,7)	0,95 (0,16, 5,8)	1,8 (0,29, 11)	7,4 (1,21, 45)
24F	4,9 (1,1, 21)	4,9 (1,11, 22)	2,6 (0,58, 11)	13 (3, 59)	21 (4,7, 92)
31	0,96 (0,23, 4,1)	1,13 (0,27, 4,8)	0,47 (0,11, 2)	2,1 (0,66, 12)	6,4 (1,51, 27)
33F	0,64 (0,18, 2,2)	0,92 (0,26, 3,3)	0,53 (0,15, 1,85)	3,6 (1,03, 13)	19 (5,5, 68)
35B	0,69 (0,25, 1,87)	1,08 (0,4, 2,9)	0,63 (0,23, 1,69)	2,1 (0,77, 5,6)	5,1 (1,9, 14)

Fig.19B

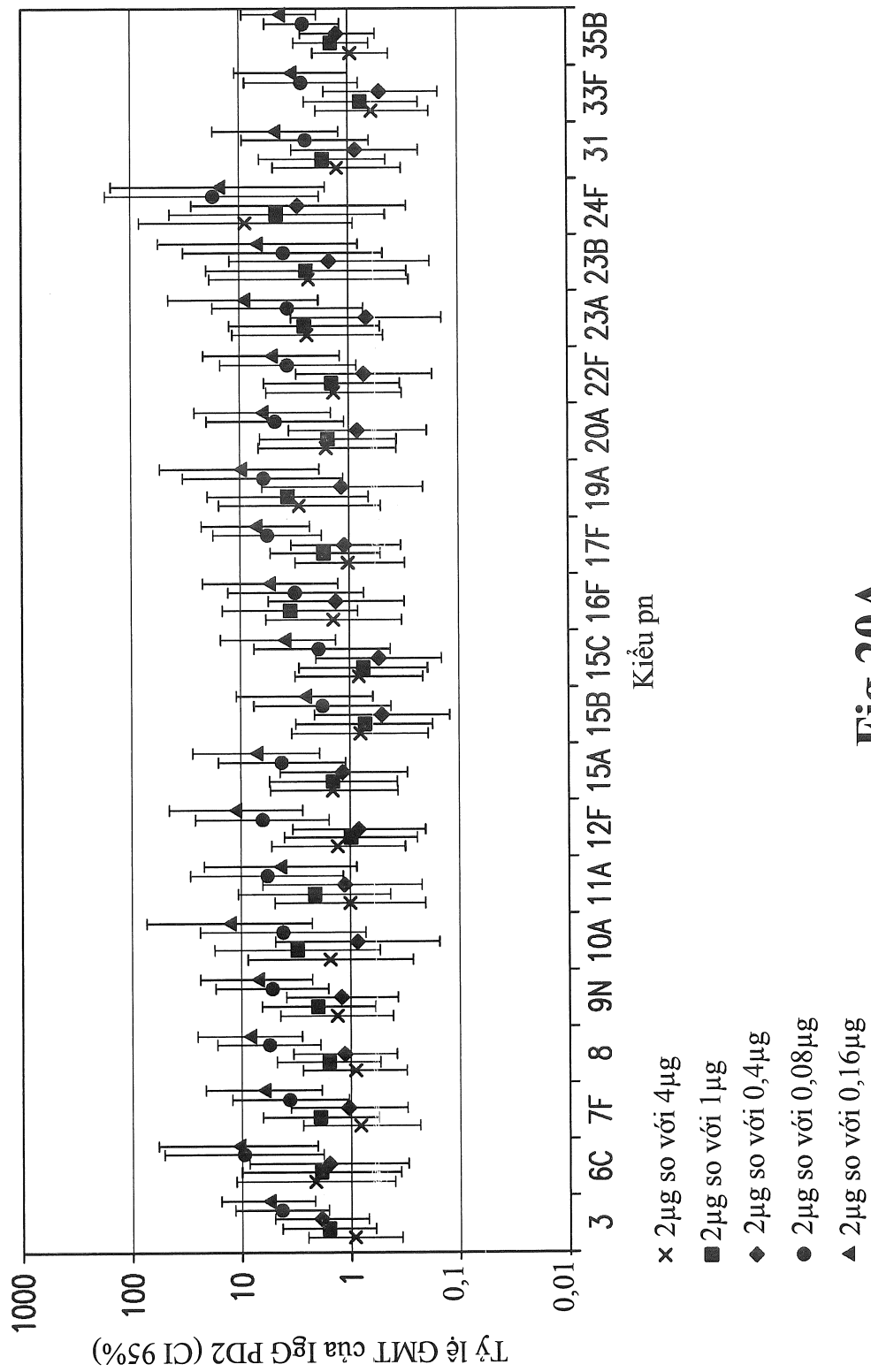


Fig.20A

Kiểu huyết thanh	2 μ g so với 4 μ g	2 μ g so với 1 μ g	2 μ g so với 0,4 μ g	2 μ g so với 0,08 μ g	2 μ g so với 0,016 μ g
3	0,91 (0,34, 2,5)	1,58 (0,59, 4,3)	1,86 (0,69, 5,0)	4,3 (1,59, 12,0)	5,7 (2,1, 15,0)
6C	2,1 (0,39, 11,0)	1,87 (0,35, 10)	1,6 (0,3, 8,6)	9,6 (1,79, 51)	11 (1,98,56)
7F	0,8 (0,23, 2,7)	1,88 (0,55, 6,4)	1,03 (0,3, 3,5)	3,6 (1,05, 12)	6,2 (1,83,21)
8	0,9 (0,3, 2,7)	1,57 (0,53, 4,7)	1,1 (0,37, 3,3)	5,5 (1,84, 17)	8,3 (2,8, 25)
9N	1,31 (0,4, 4,3)	1,92 (0,58, 6,3)	1,17 (0,36, 3,8)	5,1 (1,56, 17)	7,1 (2,2, 23)
10A	1,49 (0,26, 8,6)	3 (0,53, 17)	0,84 (0,15, 4,8)	4,1 (0,71, 23)	13 (2,2, 72)
11A	0,98 (0,2, 4,9)	2,1 (0,42, 10)	1,09 (0,22, 5,4)	5,7 (1,15, 29)	4,3 (0,86, 22)
12F	1,28 (0,31, 5,2)	0,96 (0,24, 3,9)	0,8 (0,2, 3,3)	6,3 (1,53, 26)	11 (2,7, 45)
15A	1,39 (0,36, 5,3)	1,39 (0,36, 5,3)	1,12 (0,29, 4,3)	4,1 (1,06, 16)	7,1 (1,85,27)
15B	0,79 (0,19, 3,3)	0,72 (0,17, 3)	0,49 (0,12, 2,1)	1,75 (0,41, 7,4)	2,5 (0,6, 11)
15C	0,81 (0,21, 3,1)	0,74 (0,19, 2,9)	0,53 (0,14, 2)	1,92 (0,5, 7,4)	3,9 (1,03,15)
16F	1,37 (0,33, 5,8)	3,5 (0,83, 15)	1,31 (0,31, 5,5)	3,1 (0,73, 13)	5,2 (1,24,22)
17F	0,99 (0,31, 3,1)	1,65 (0,52, 5,2)	1,06 (0,33, 3,4)	5,6 (1,76, 18)	7,1 (2,3, 23)
19A	2,8 (0,51, 16)	3,6 (0,65, 20)	1,13 (0,21, 6,2)	6,1 (1,0, 33)	9,8 (1,78,54)
20A	1,59 (0,37, 6,8)	1,53 (0,36, 6,5)	0,83 (0,19, 3,5)	4,7 (1,1, 20)	6,2 (1,45,26)
22F	1,34 (0,32, 5,7)	1,42 (0,34, 6)	0,72 (0,17, 3)	3,6 (0,84, 15)	5,1 (1,2, 21)
23A	2,4 (0,48, 12)	2,5 (0,51, 12)	0,67 (0,14, 3,3)	3,6 (0,74, 18)	9,1 (1,84,45)
23B	2,3 (0,28, 19)	2,4 (0,29, 20)	1,49 (0,18, 12)	4 (0,48, 33)	6,8 (0,82,56)
24F	8,6 (0,9, 83)	4,5 (0,46, 43)	2,9 (0,3, 28)	18 (1,85, 172)	16 (1,61,150)
31	1,26 (0,33, 4,8)	1,17 (0,45, 6,5)	0,86 (0,23, 3,3)	2,5 (0,64, 9,4)	4,7 (1,22,18)
33F	0,6 (0,18, 1,97)	0,77 (0,23, 2,5)	0,5 (0,15, 1,65)	2,7 (0,81, 8,9)	3,4 (1,02,11)
35B	0,94 (0,43, 2,1)	1,41 (0,64, 3,1)	1,24 (0,56, 2,8)	2,6 (1,18, 5,8)	4,3 (1,94,9,6)

Fig.20B

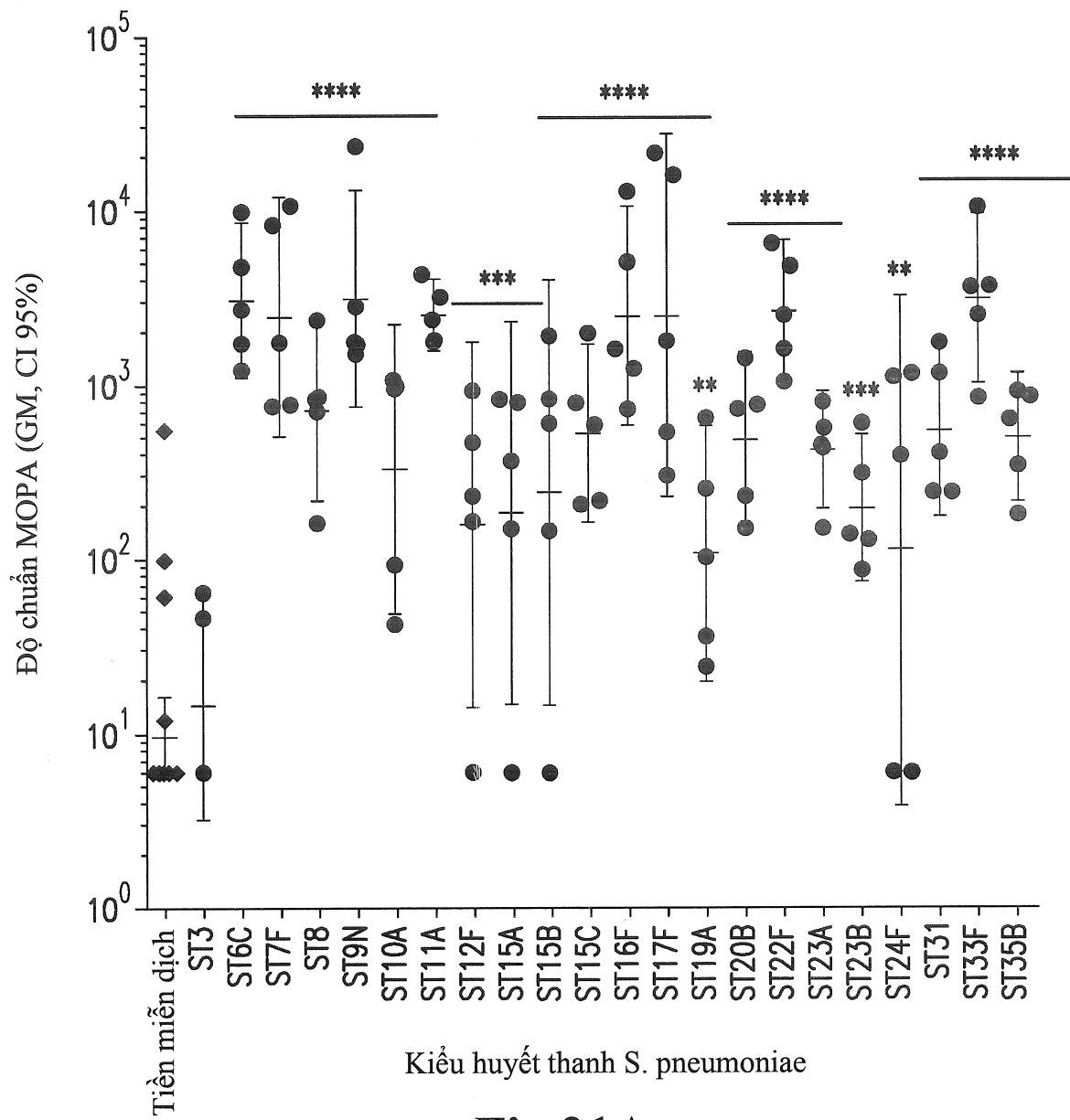


Fig.21A

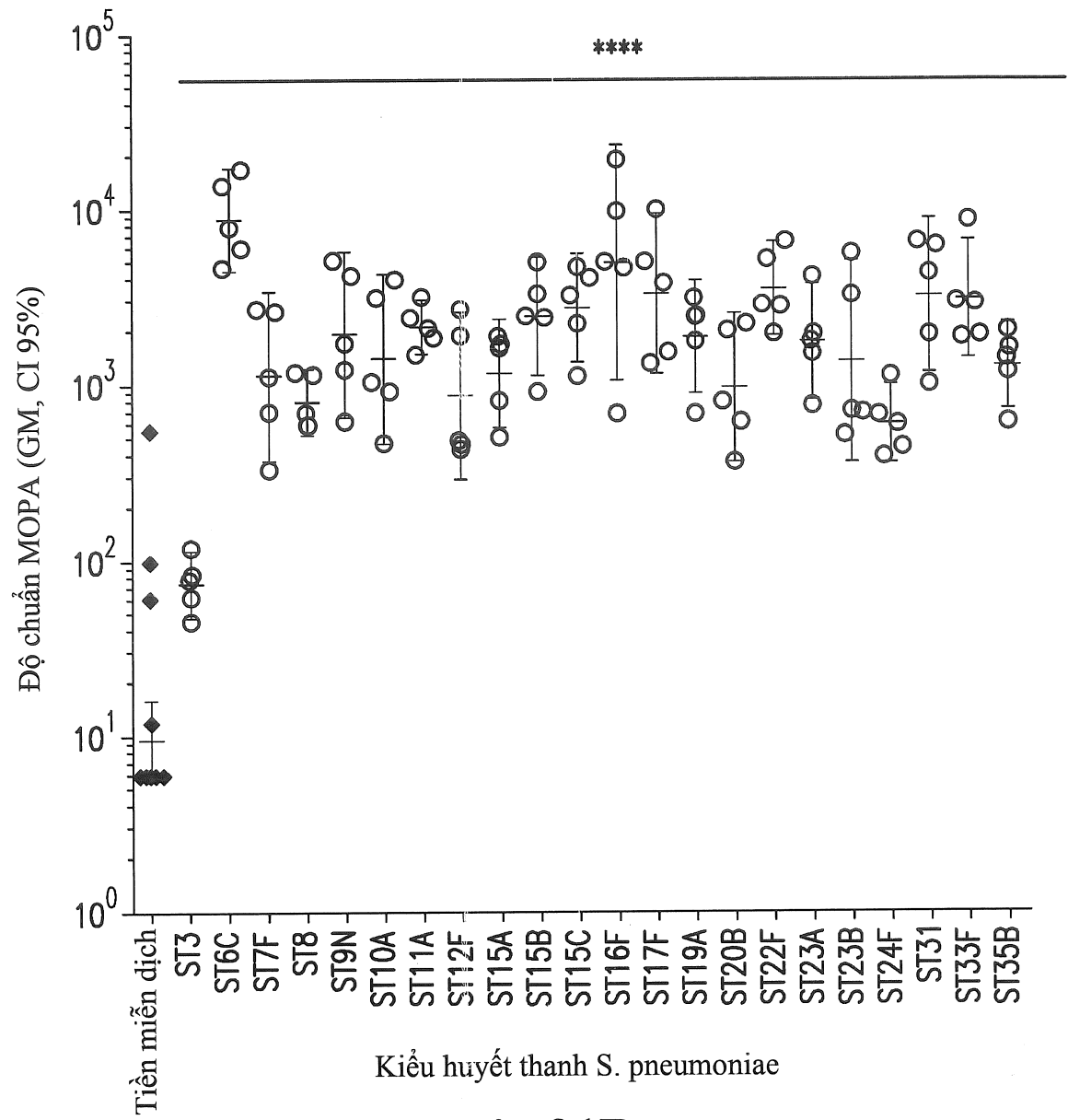
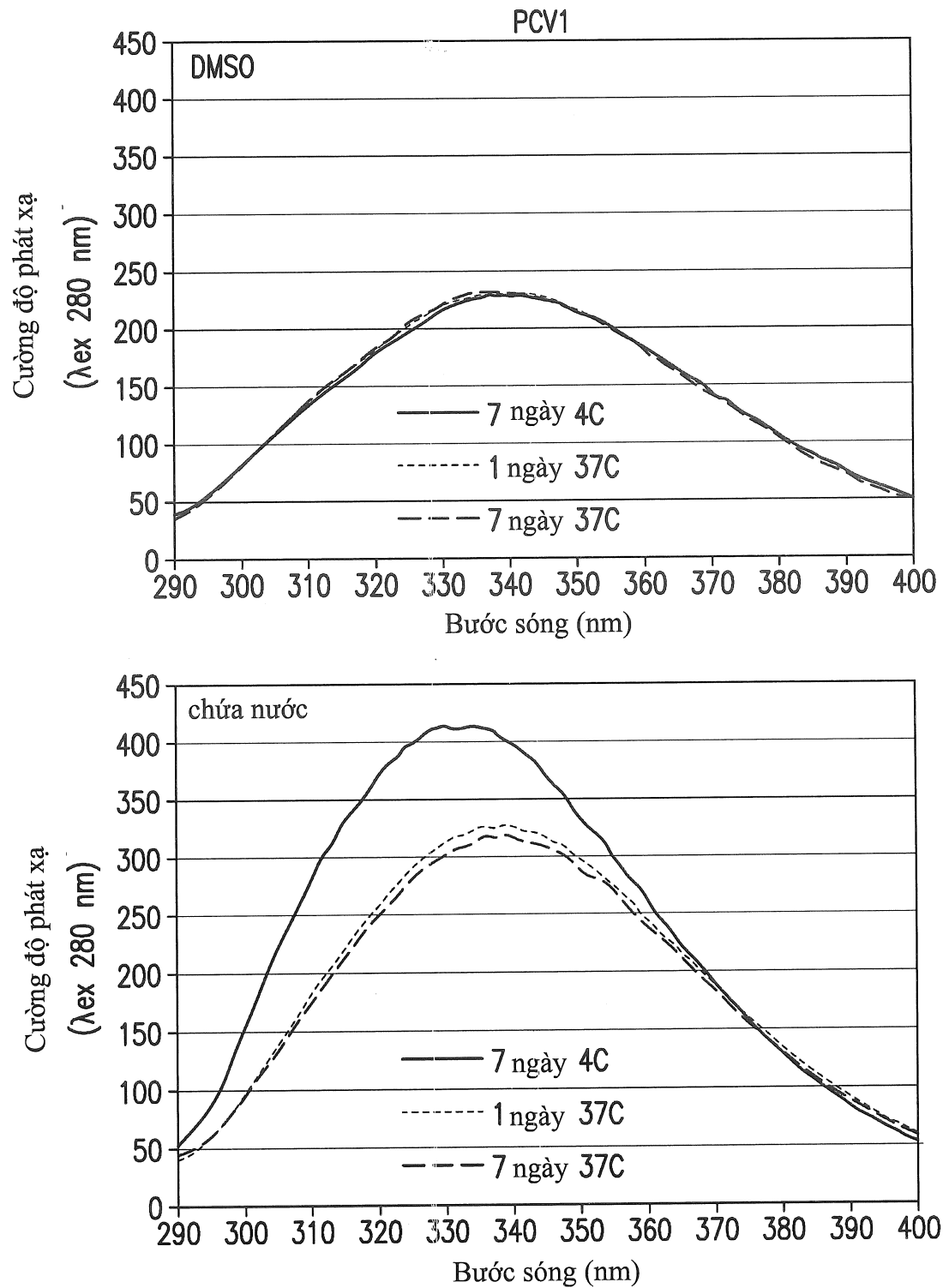
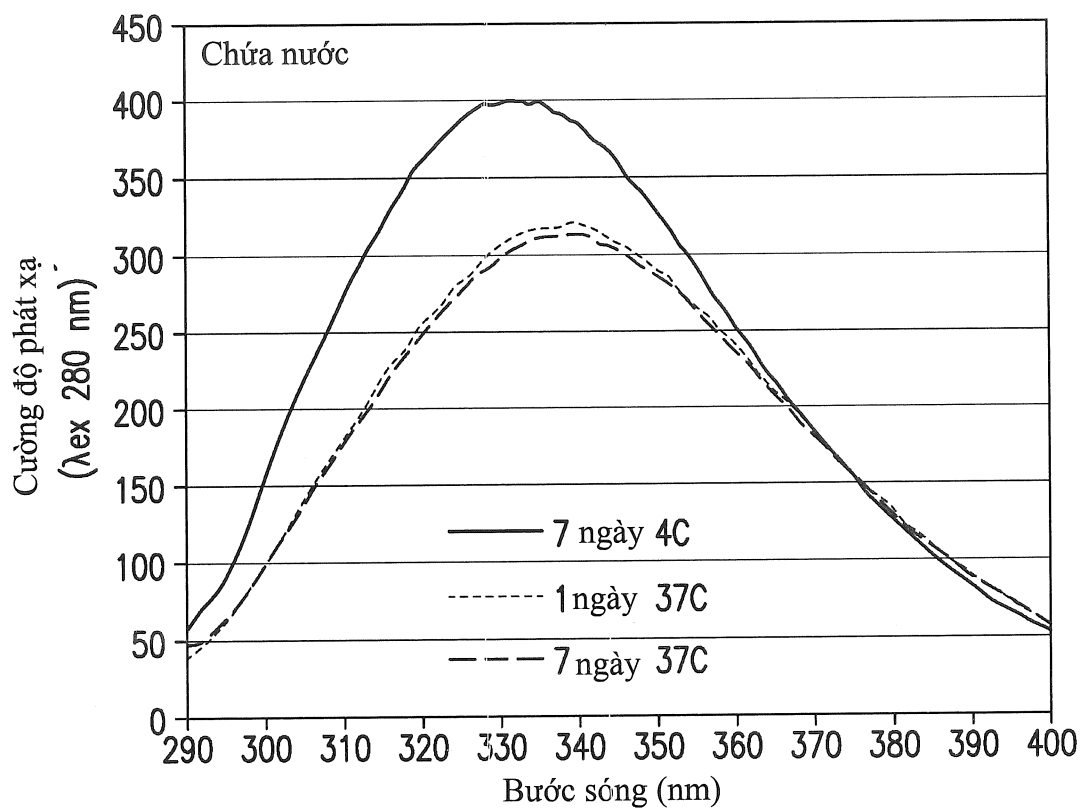
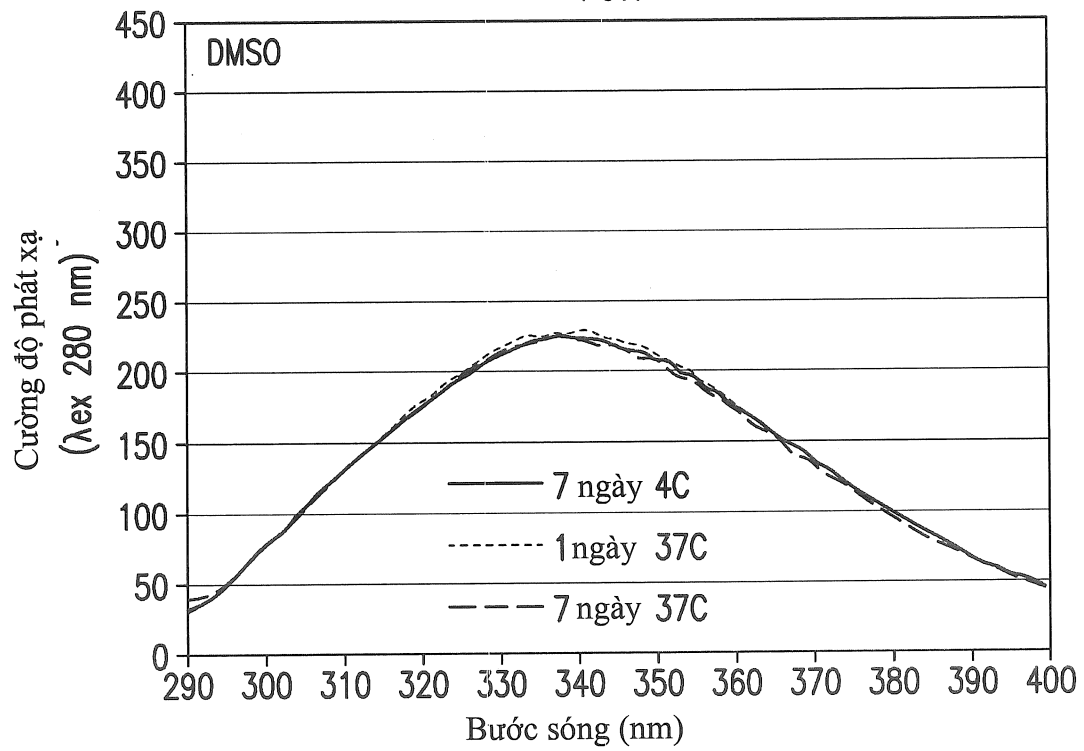


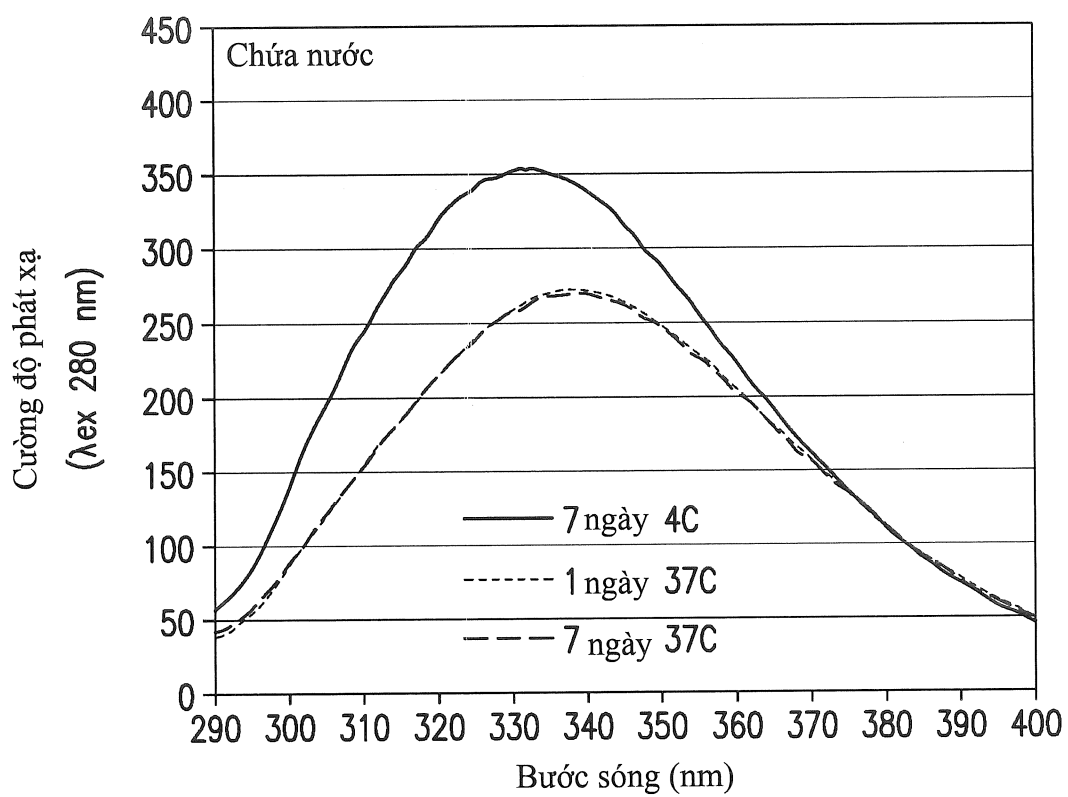
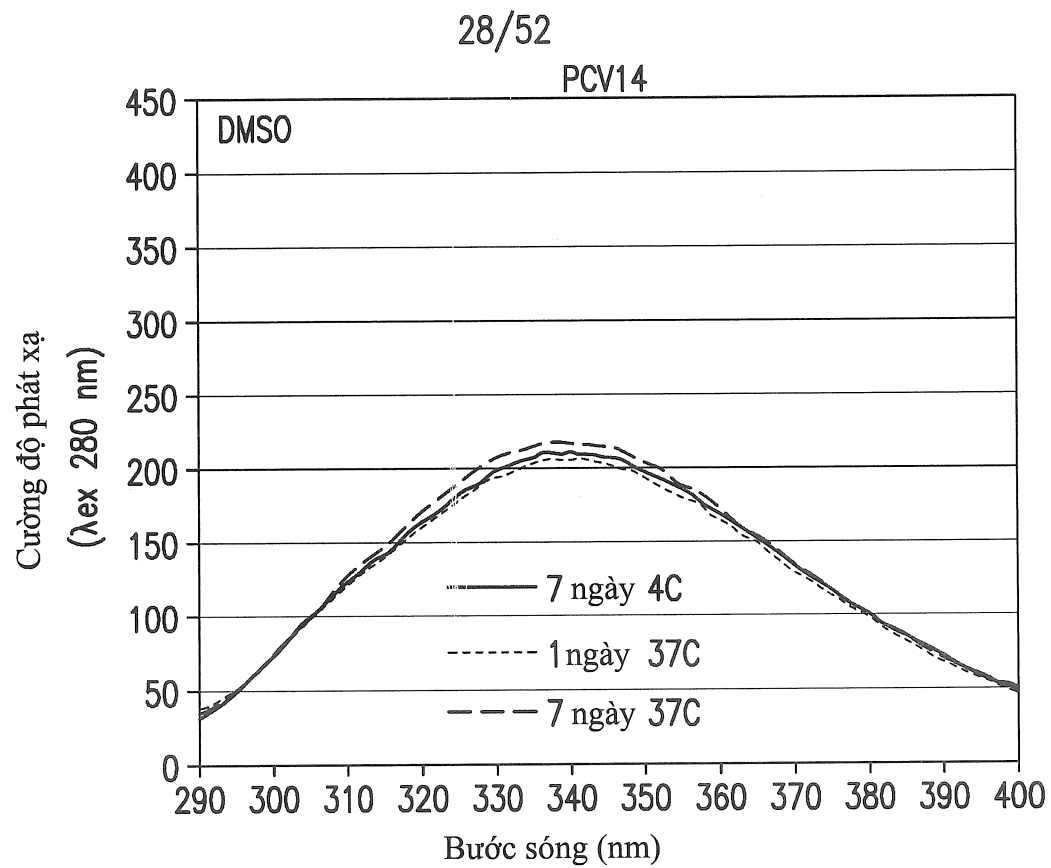
Fig.21B

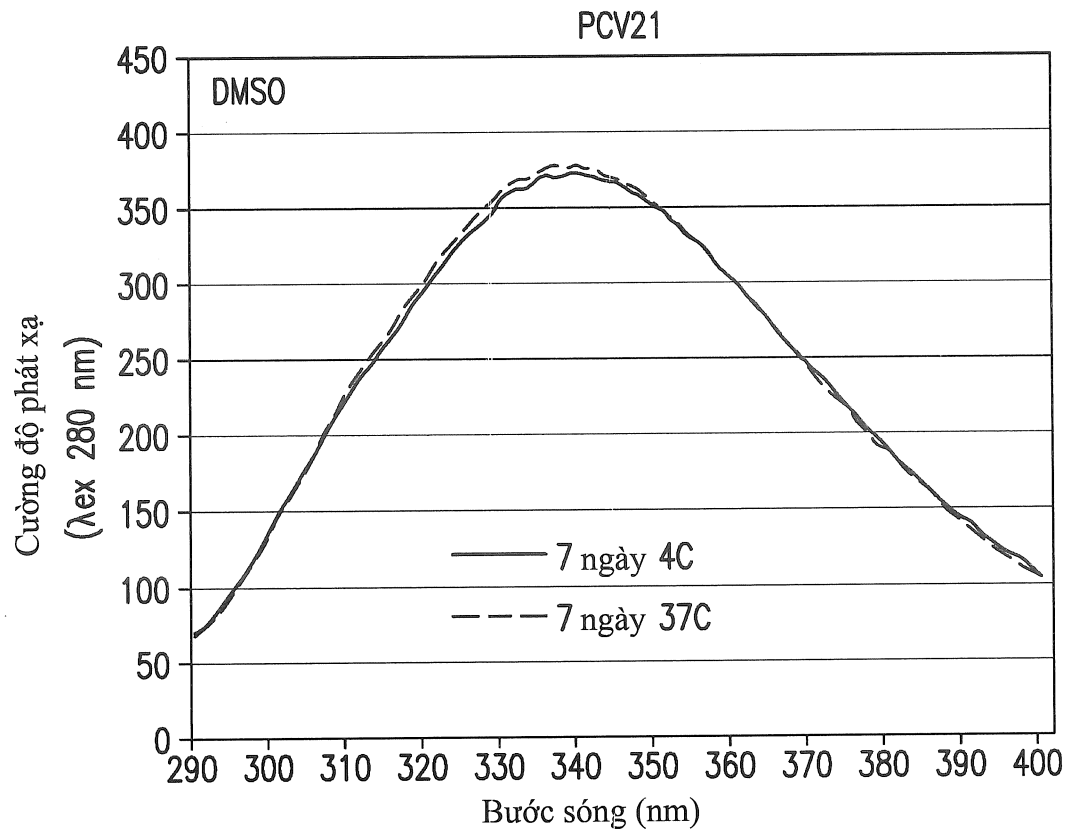
**Fig.22A**

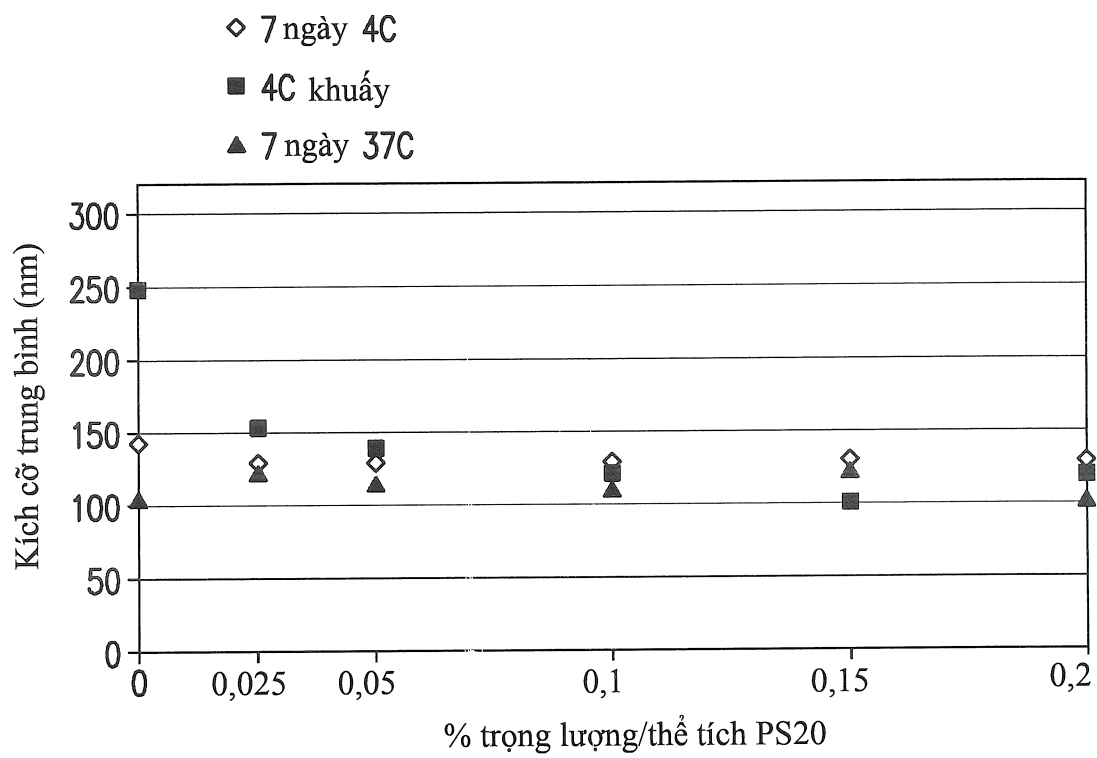
27/52

PCV7

**Fig.22B**

**Fig.22C**

**Fig.22D**

**Fig.23**

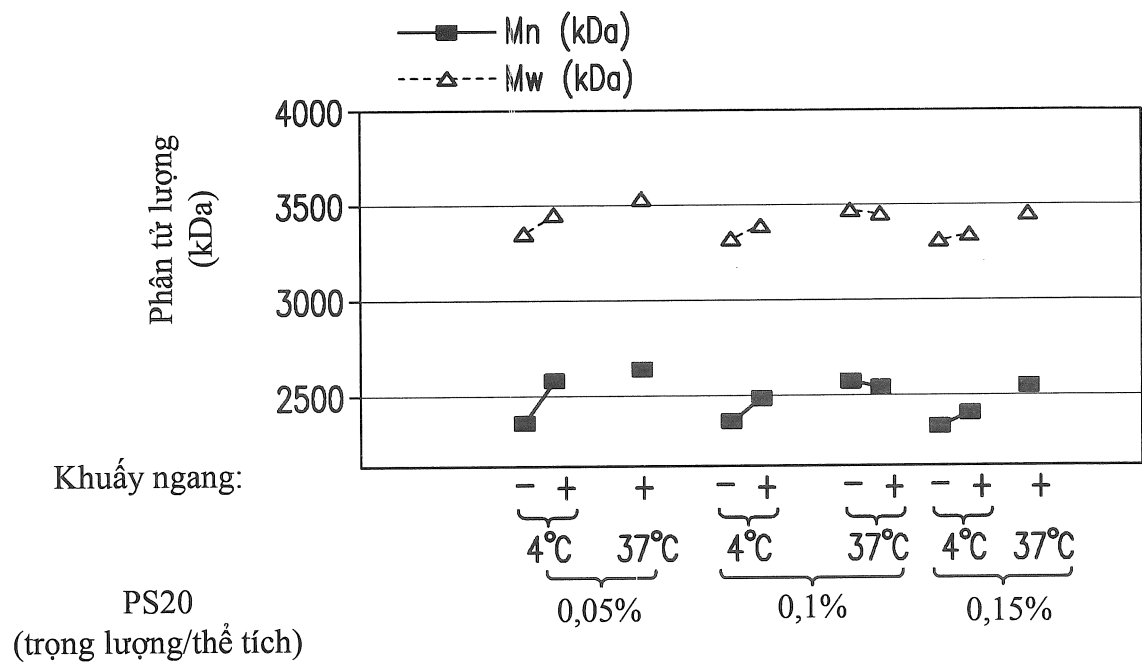
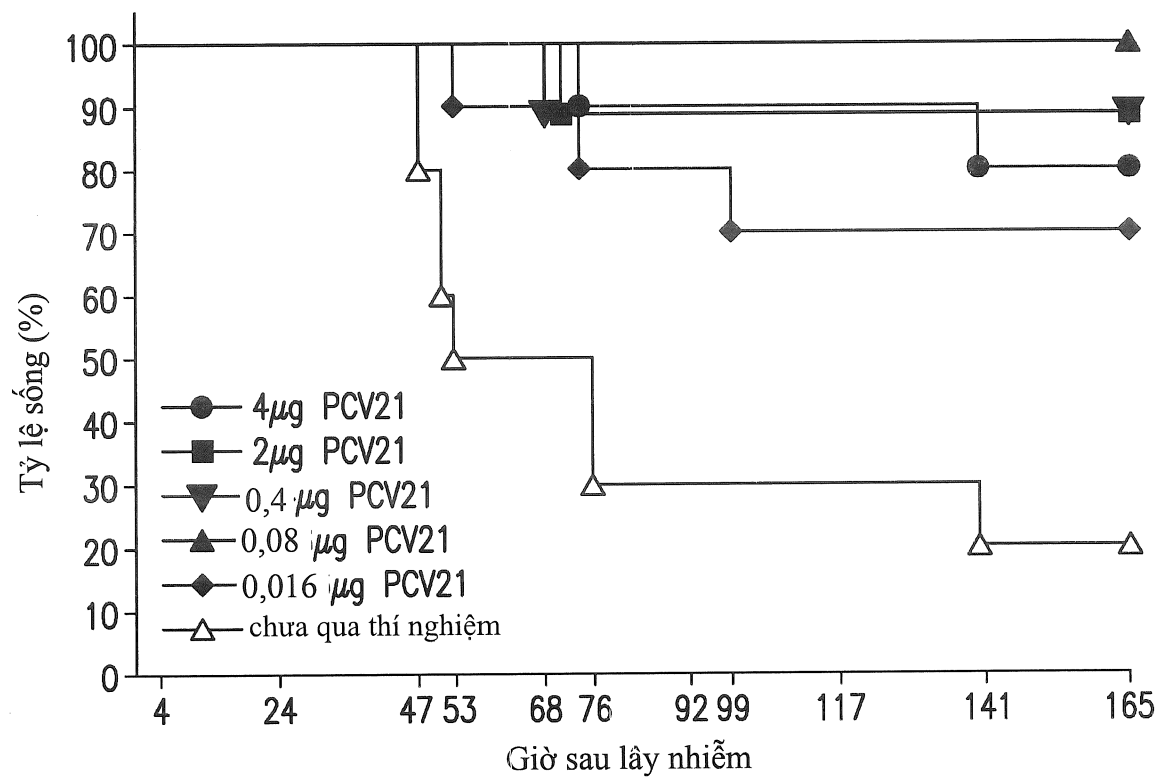


Fig.24

**Fig.25**

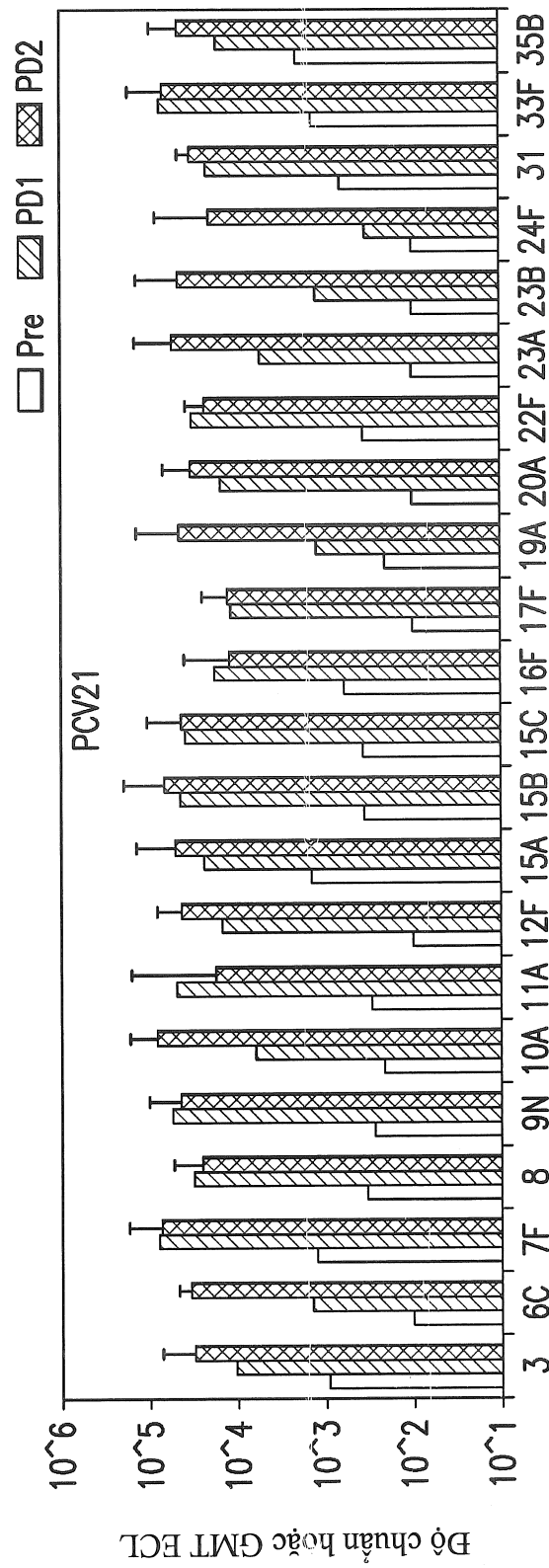
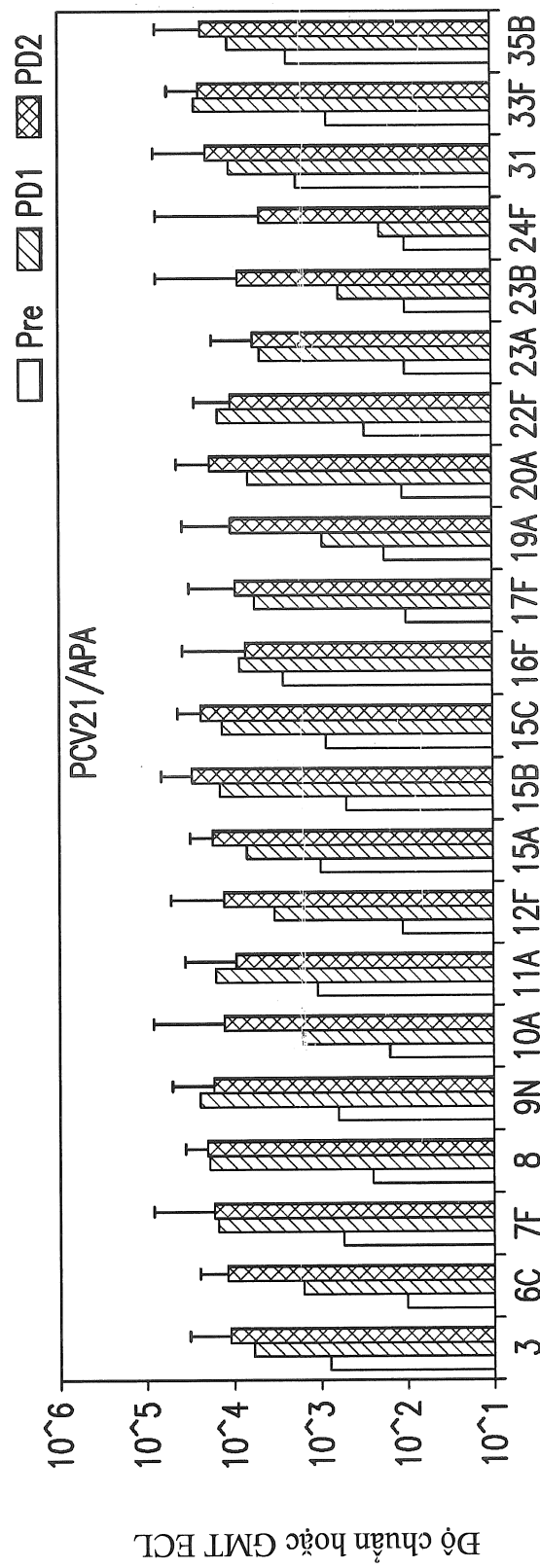


Fig.26A

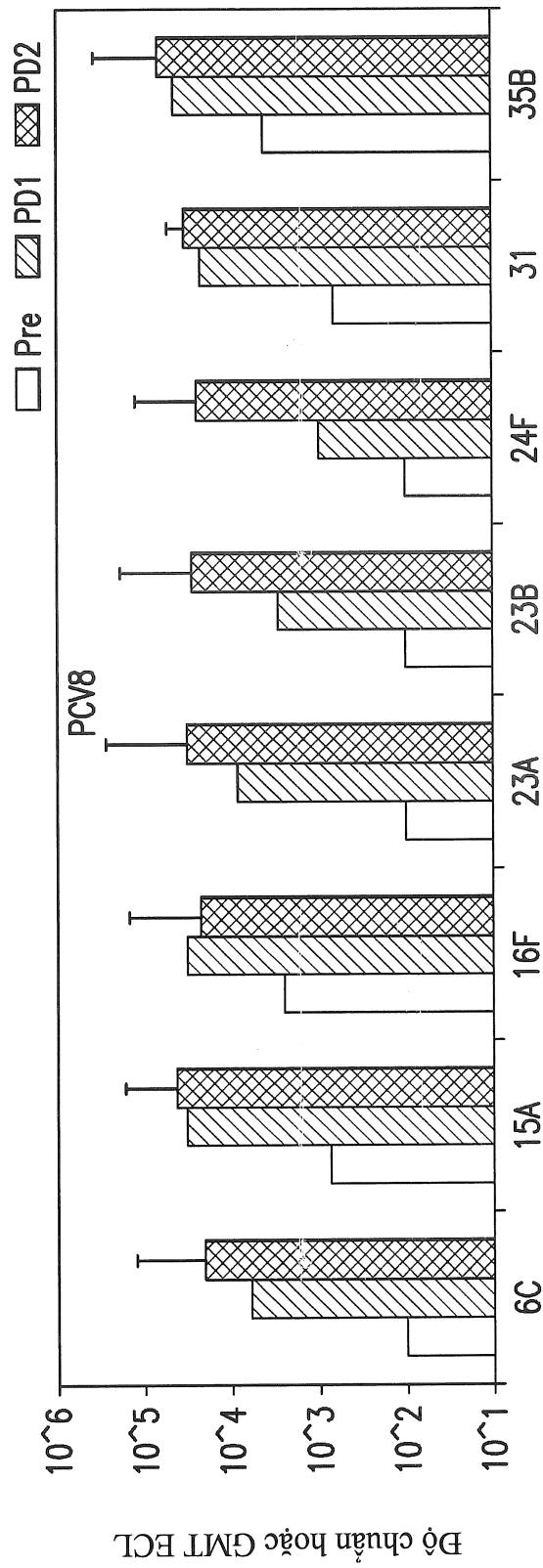
34/52



Kiểu huyết thanh

Fig.26A

35/52



Kiểu huyết thanh

Fig.27A

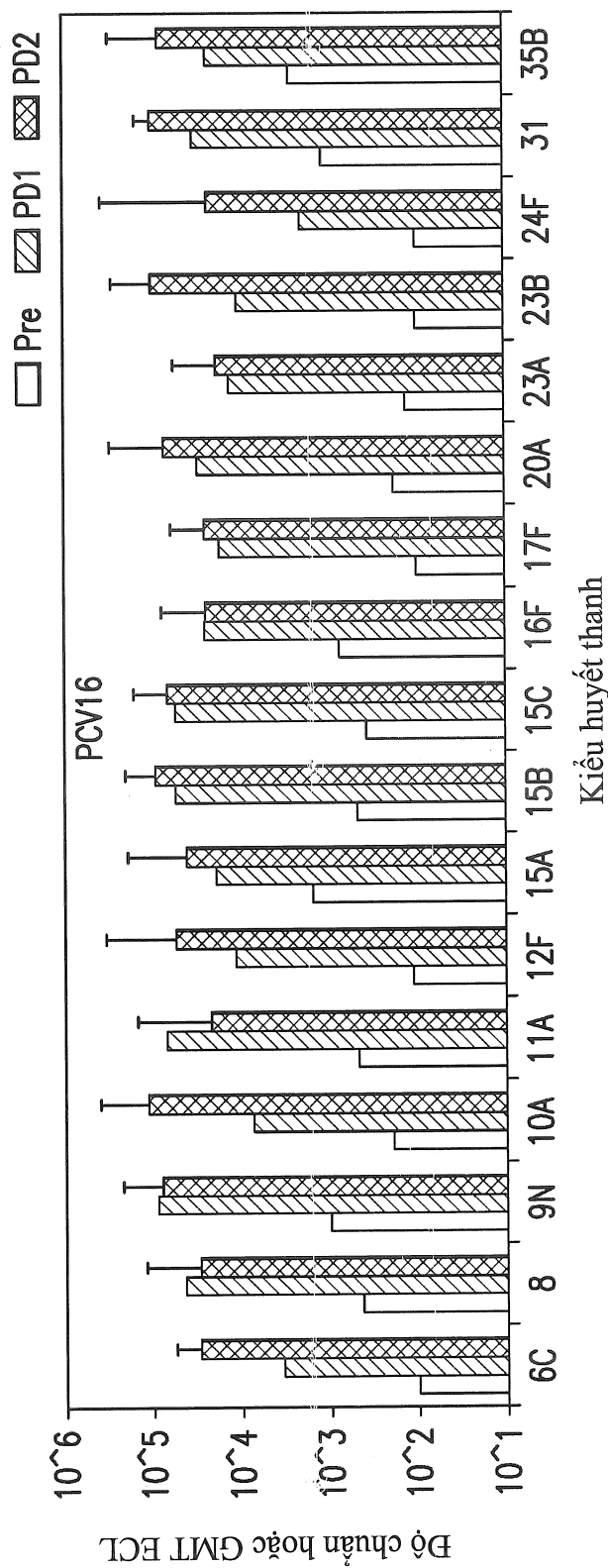


Fig.27B

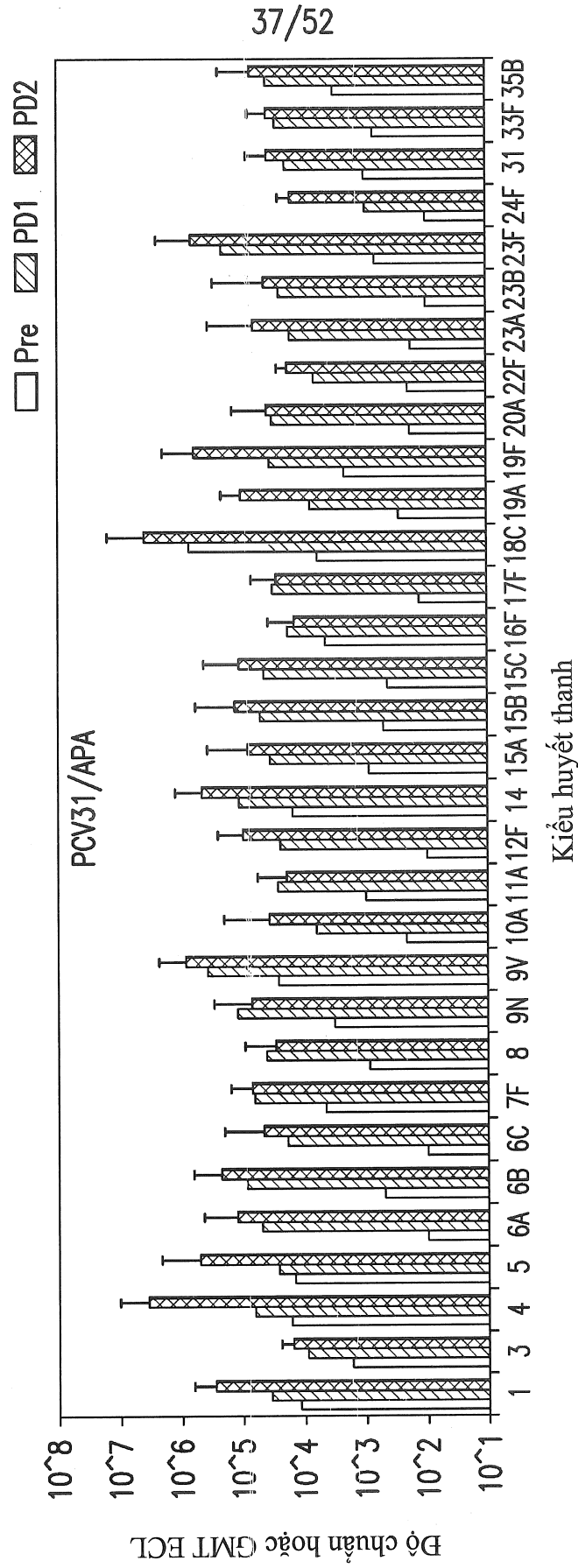
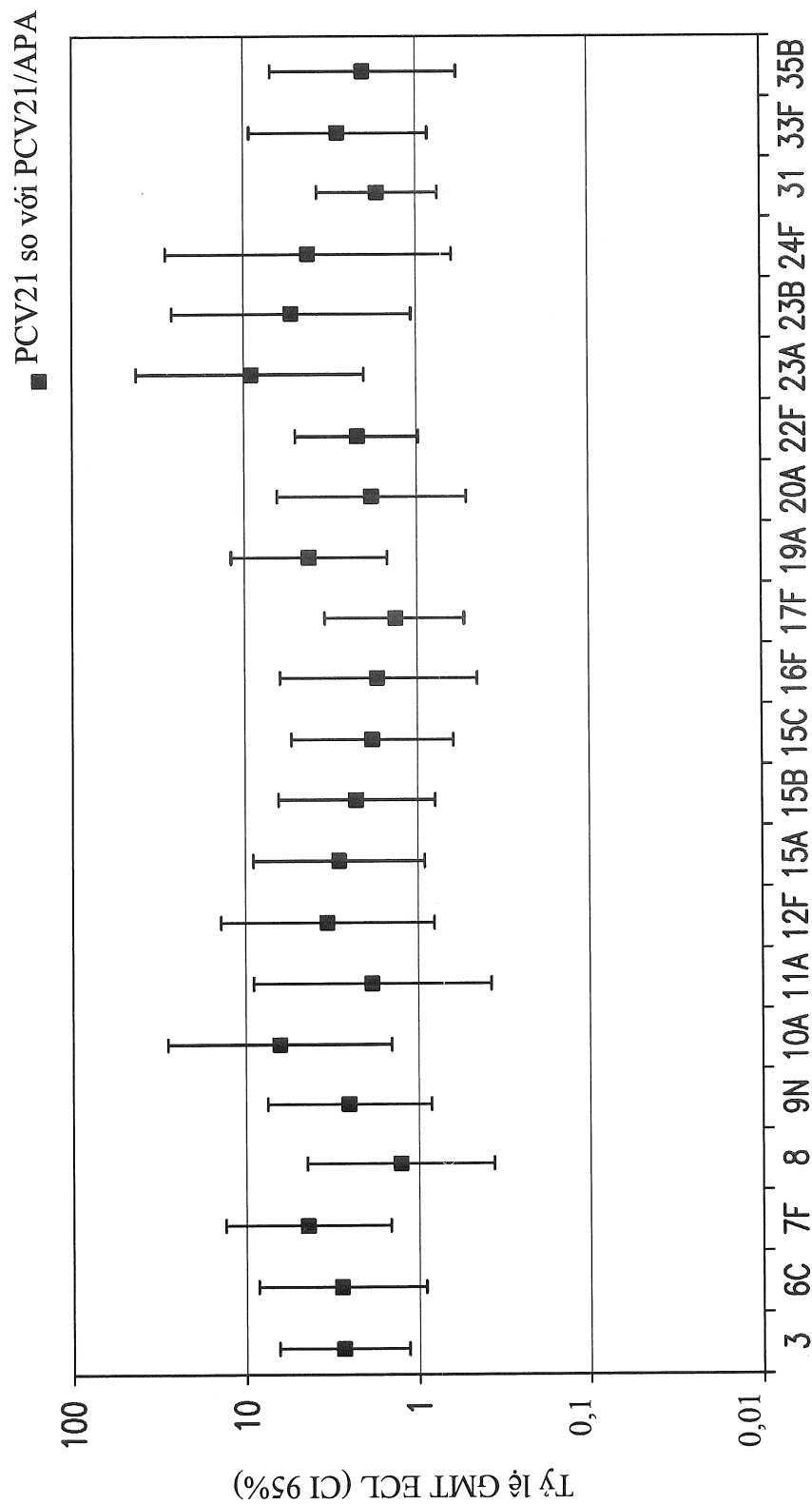


Fig.27C



Kiểu huyết thanh
Fig.28

39/52

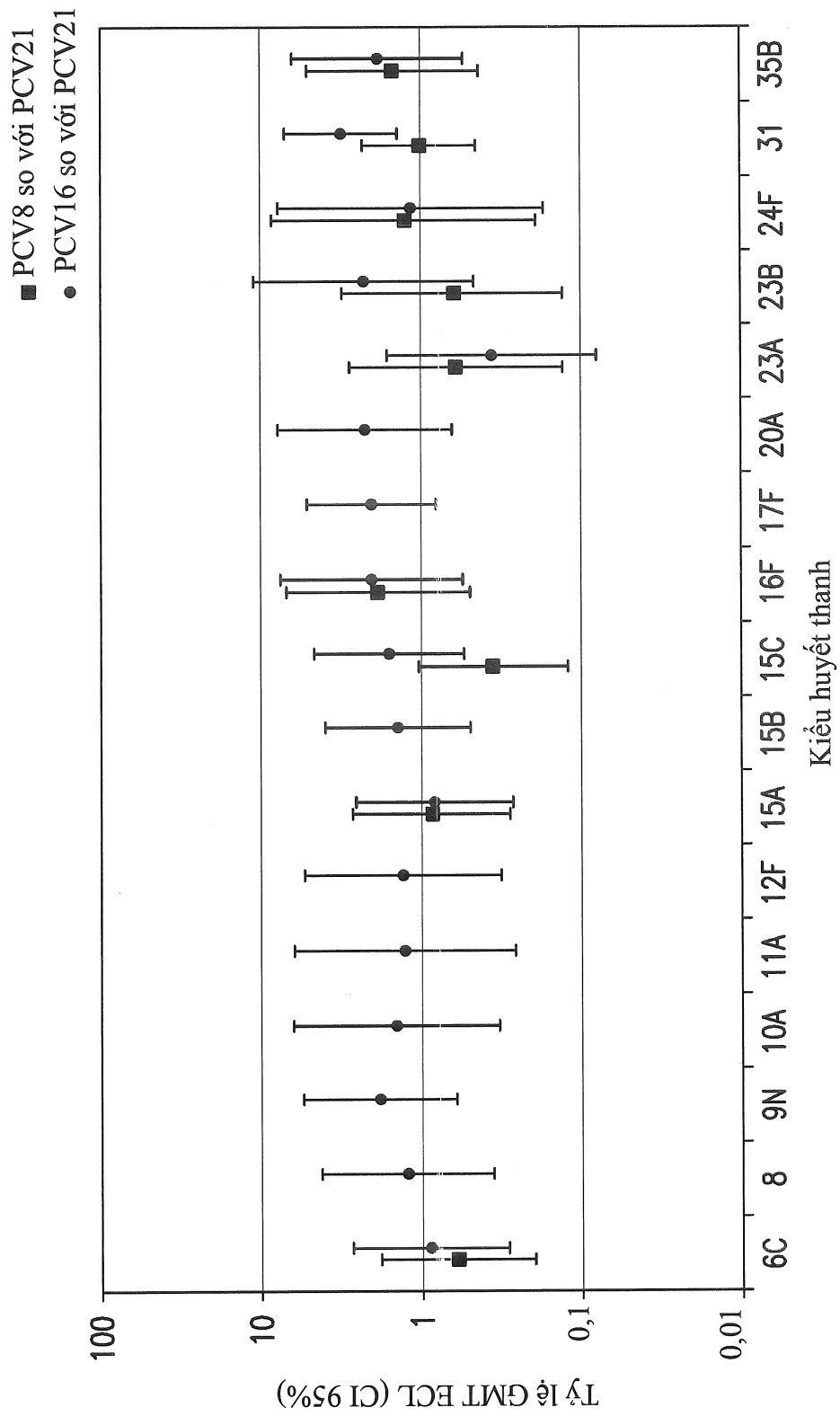
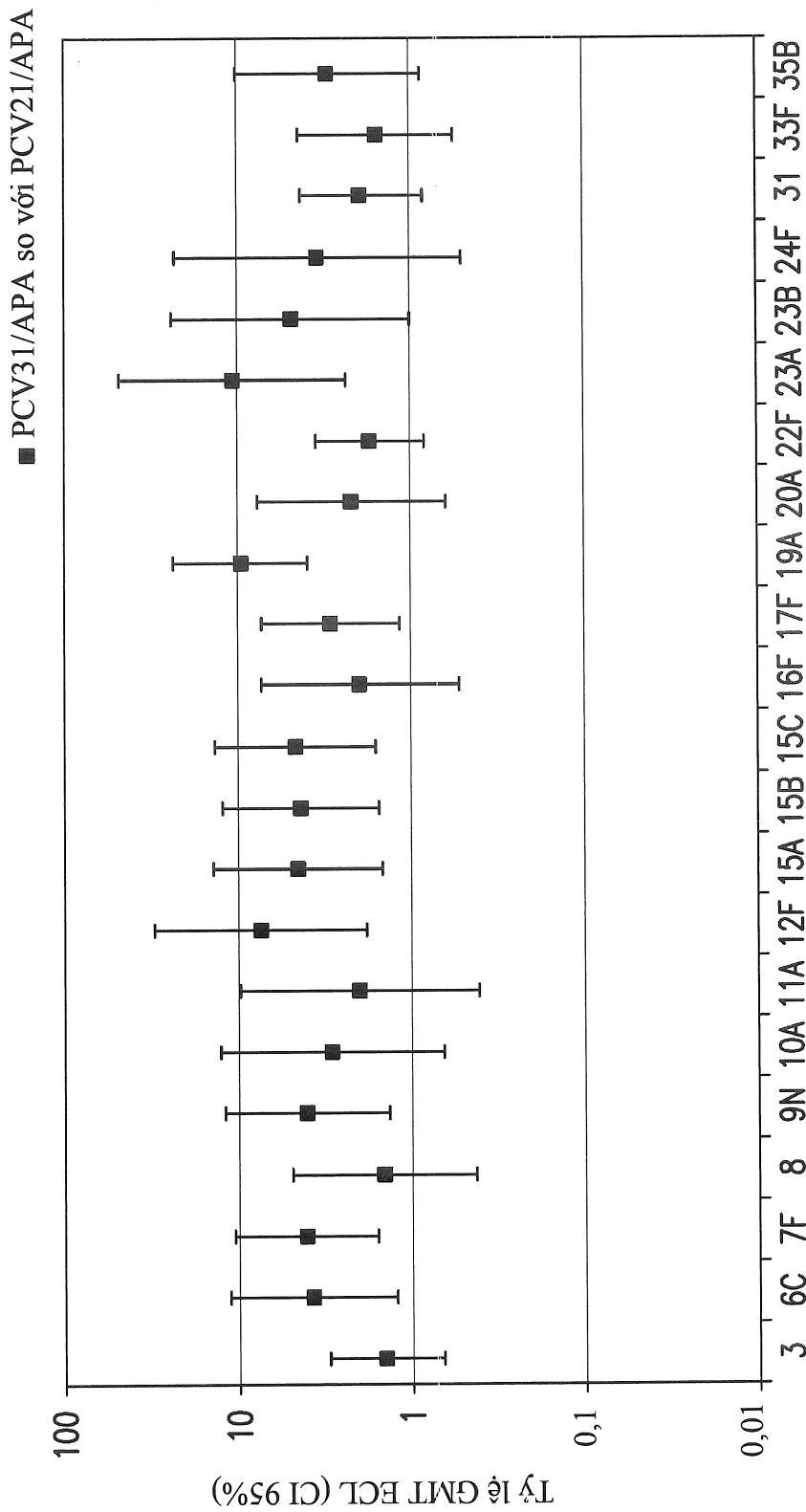


Fig.29



Kiểu huyết thanh

Fig.30

41/52

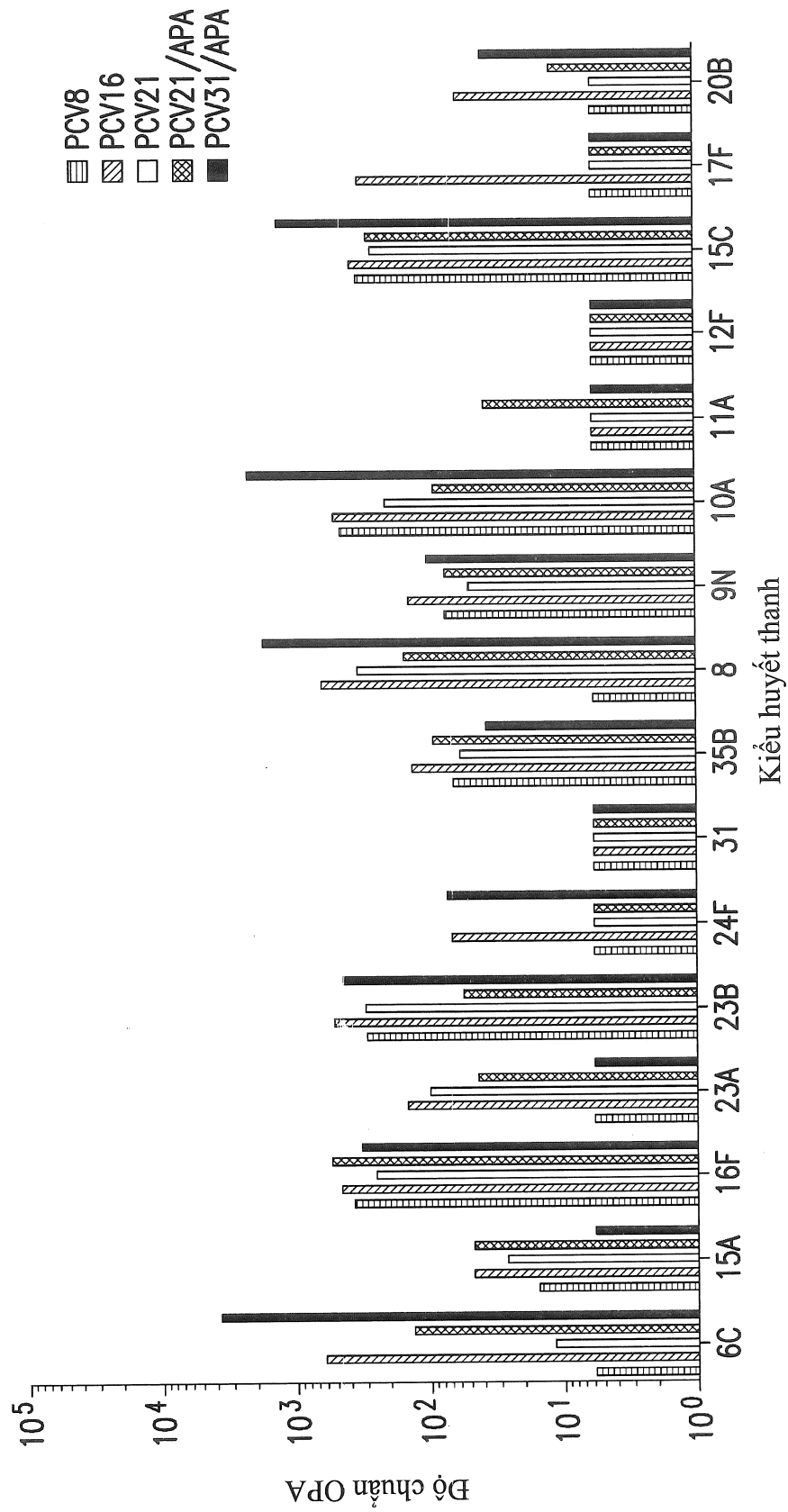


Fig.31A

42/52

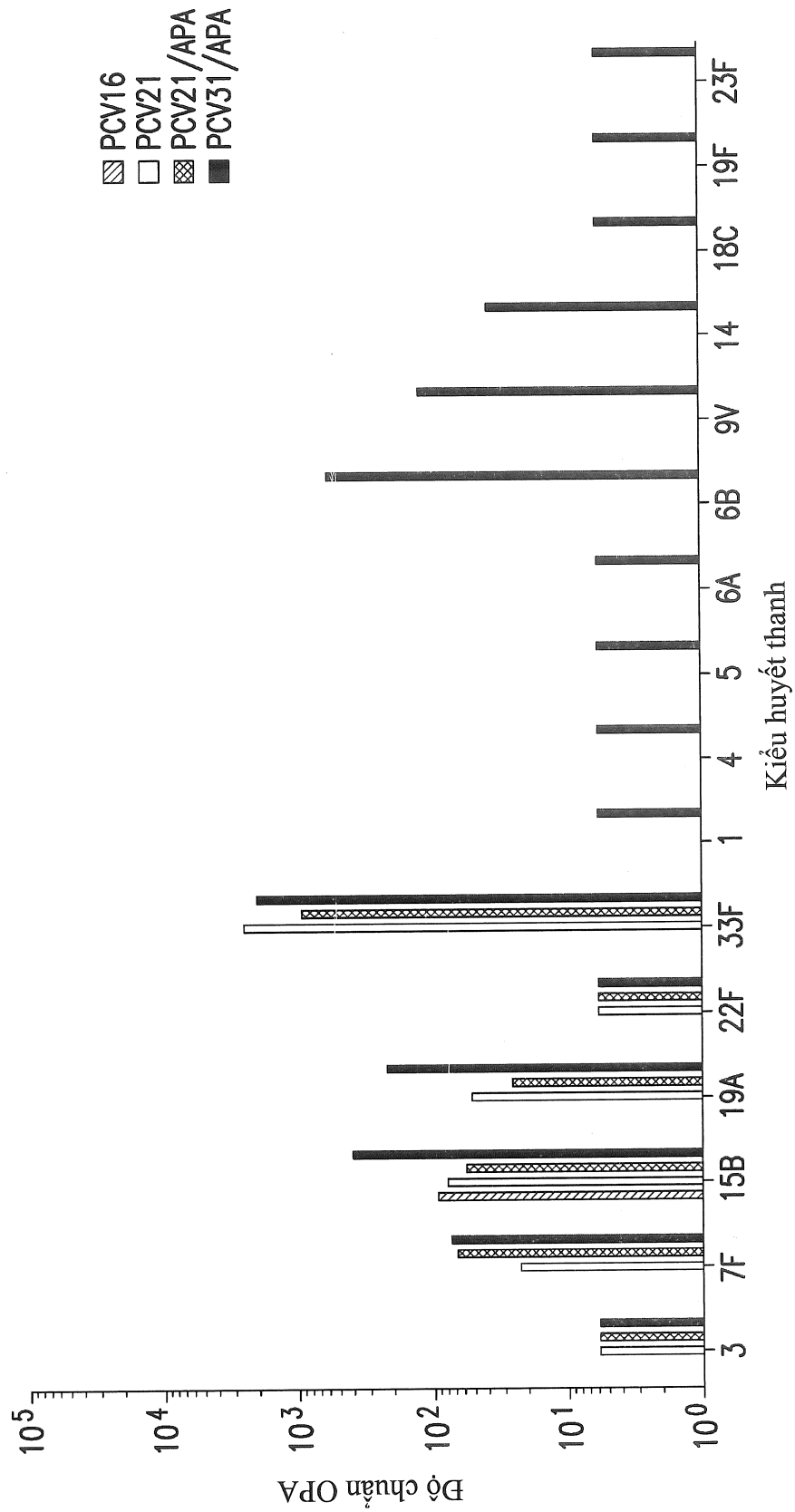


Fig.31B

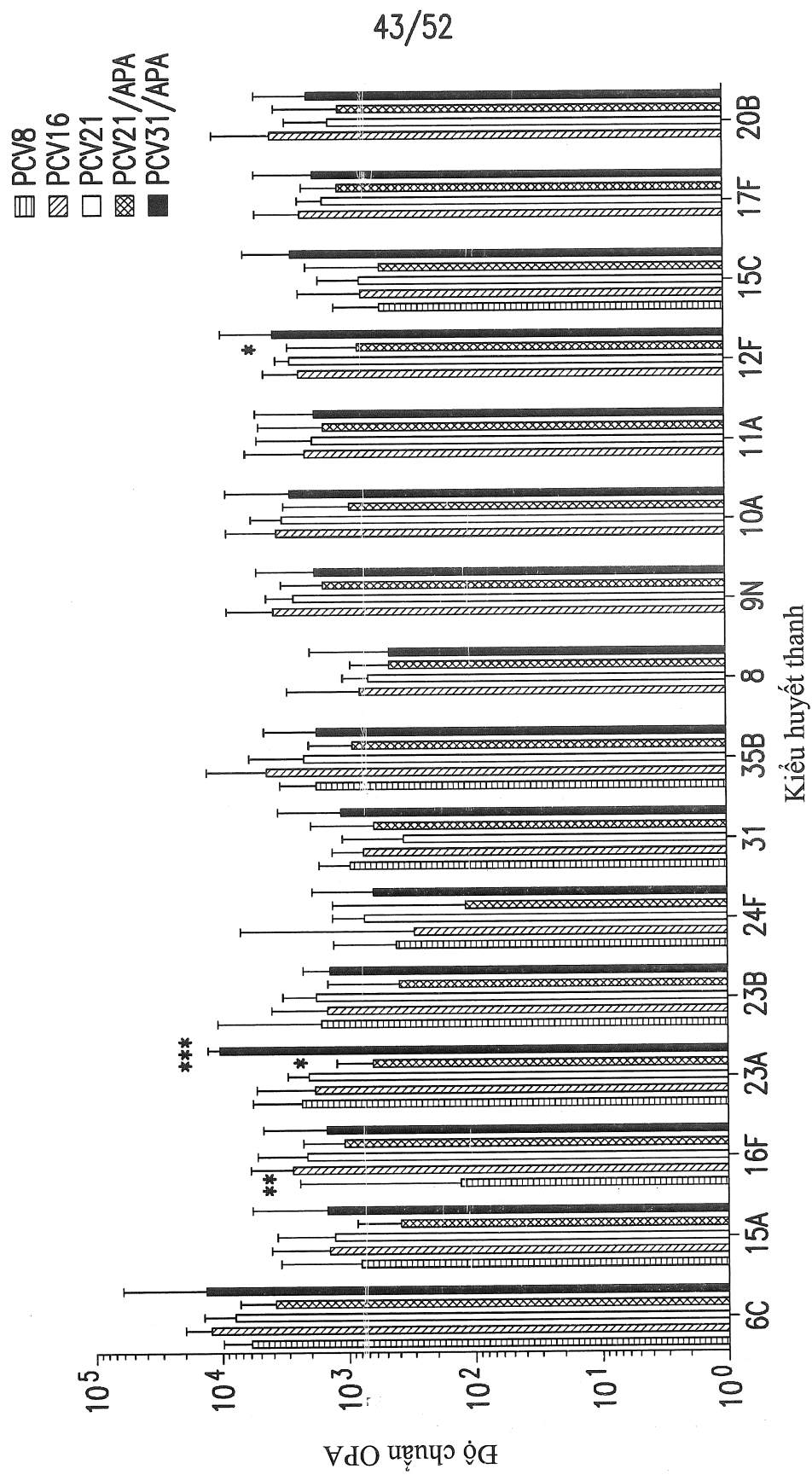


Fig.31C

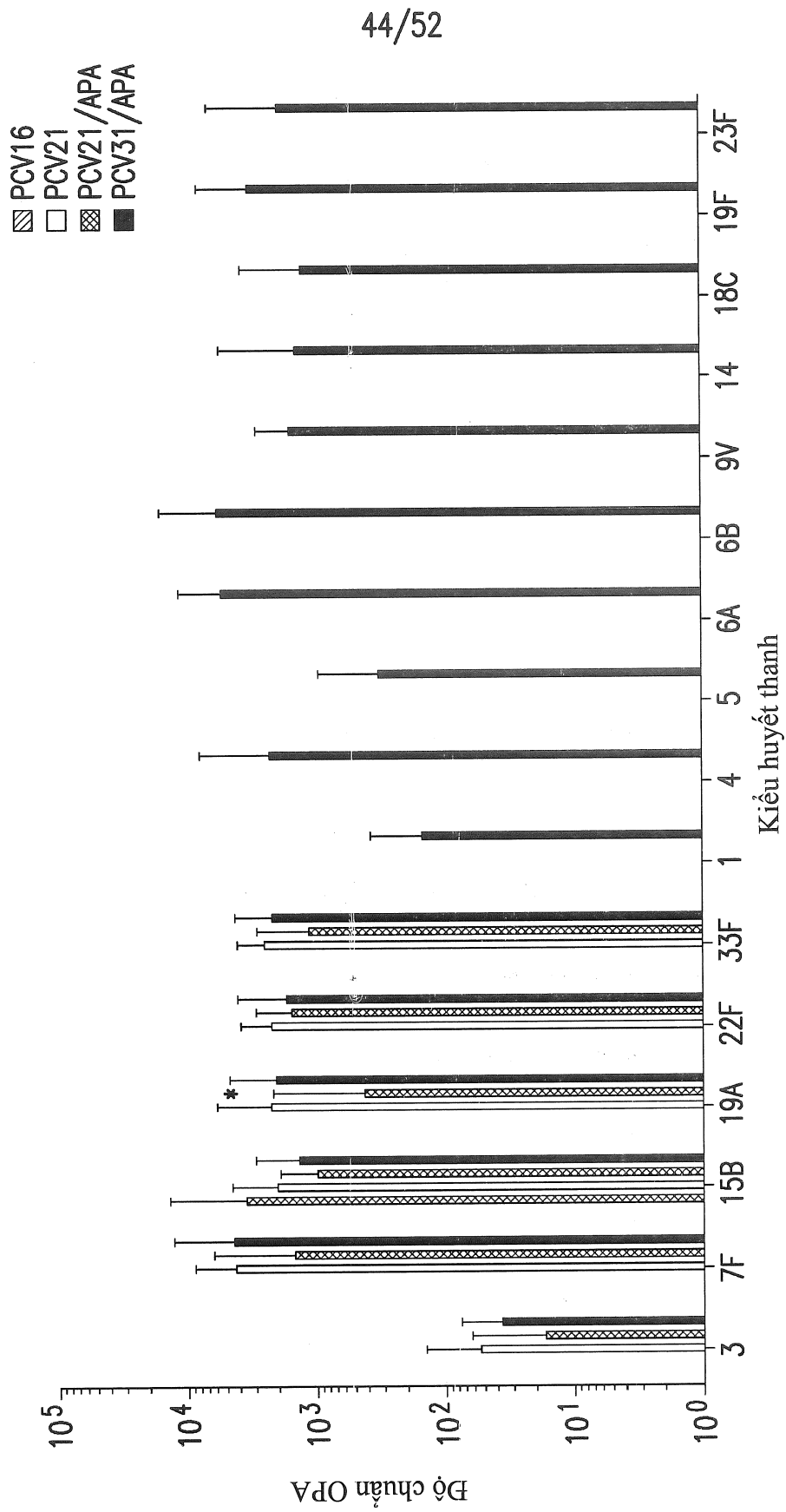


Fig.31D

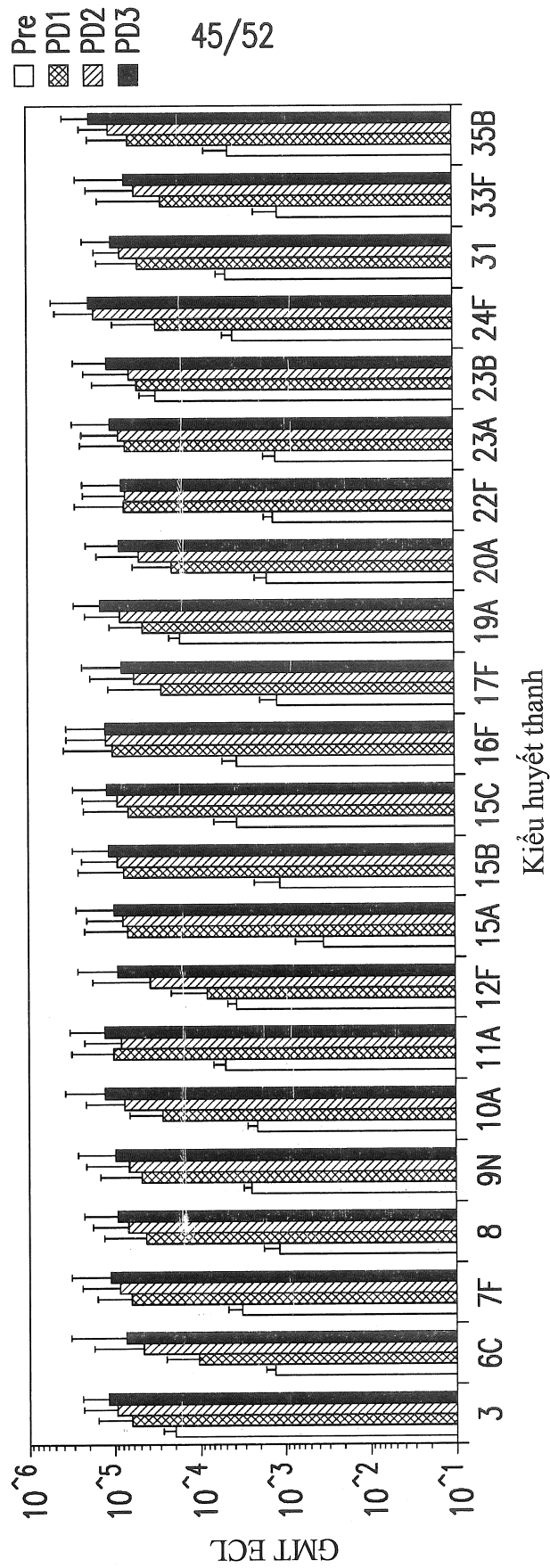


Fig.32

46/52

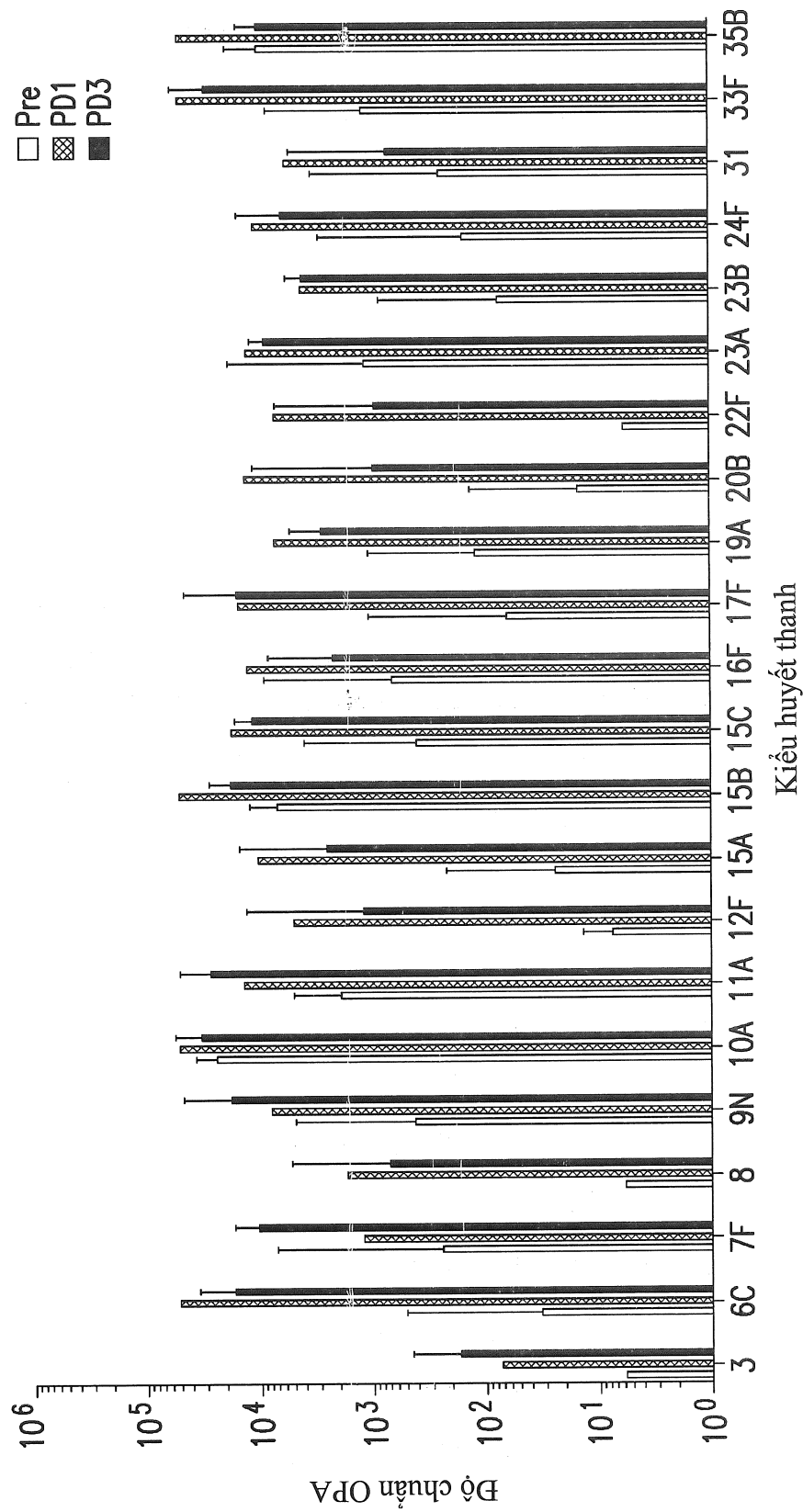
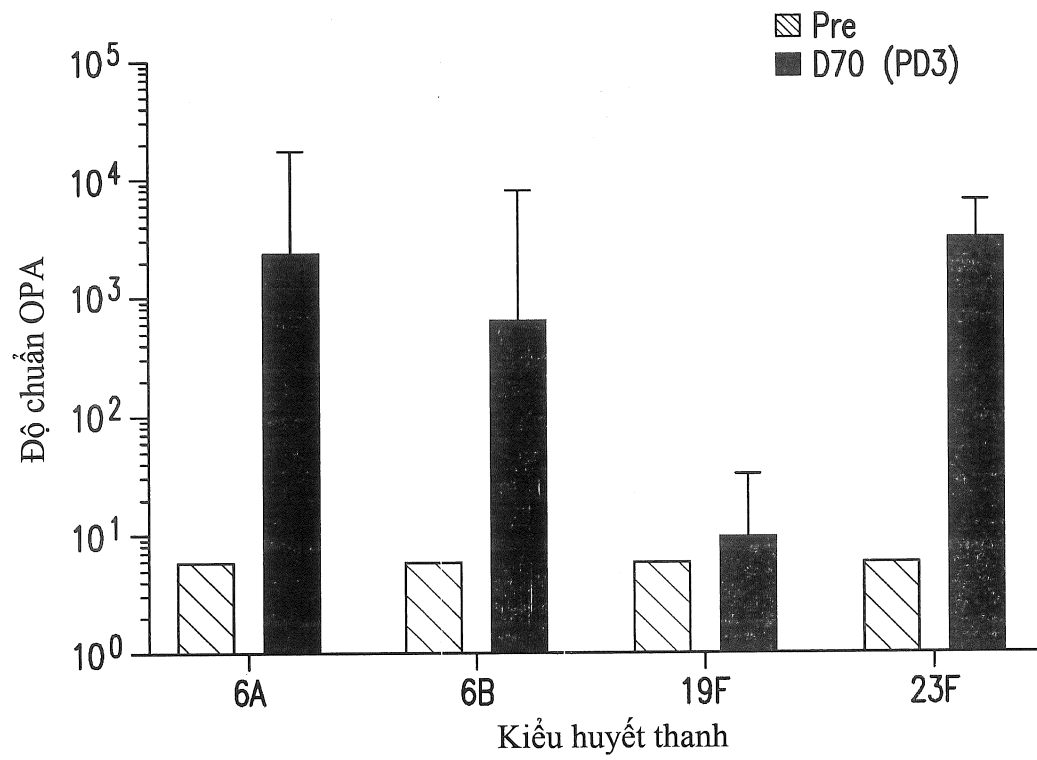


Fig.33

47/52

**Fig.34**

48/52

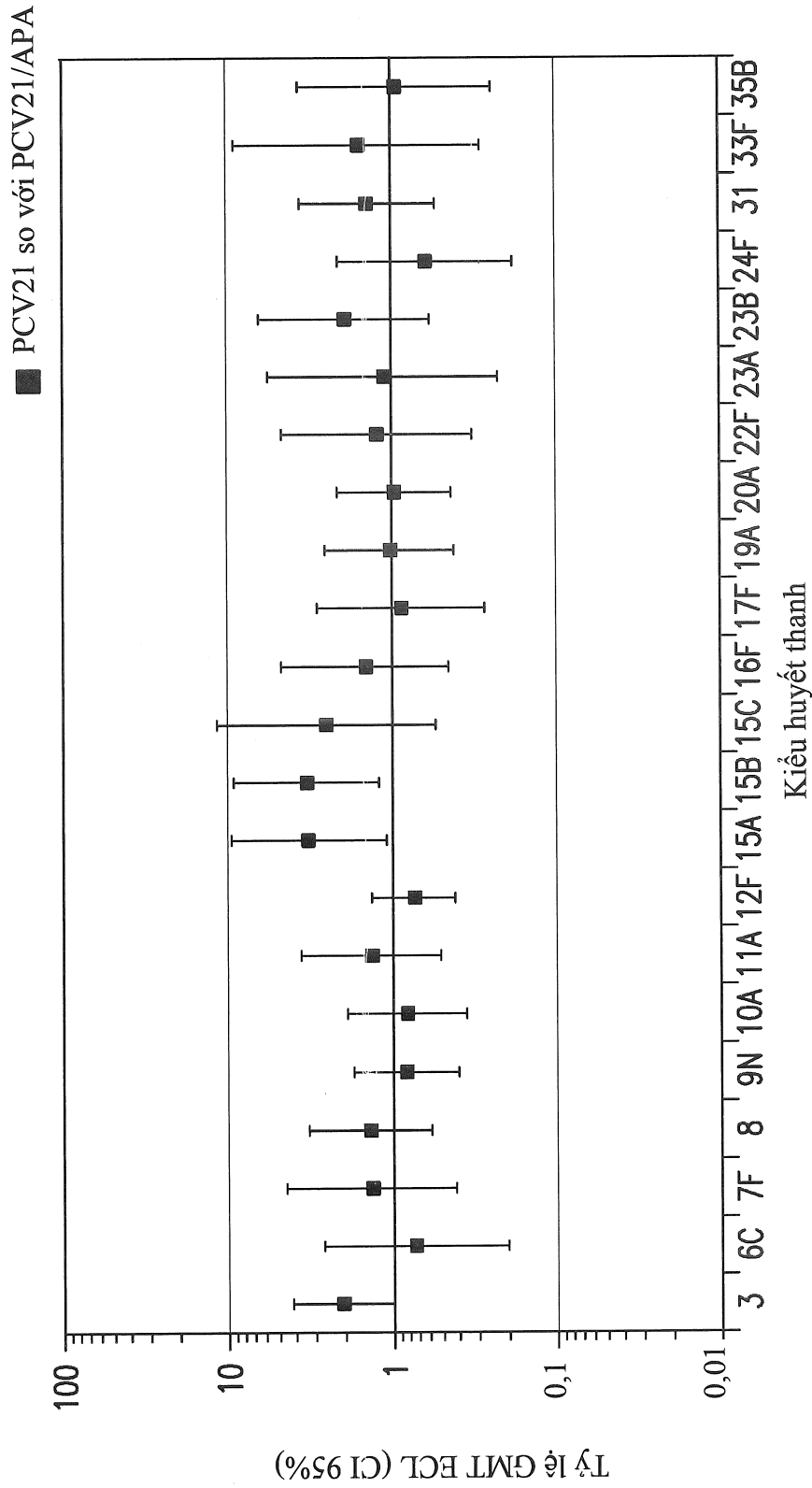


Fig.35

49/52

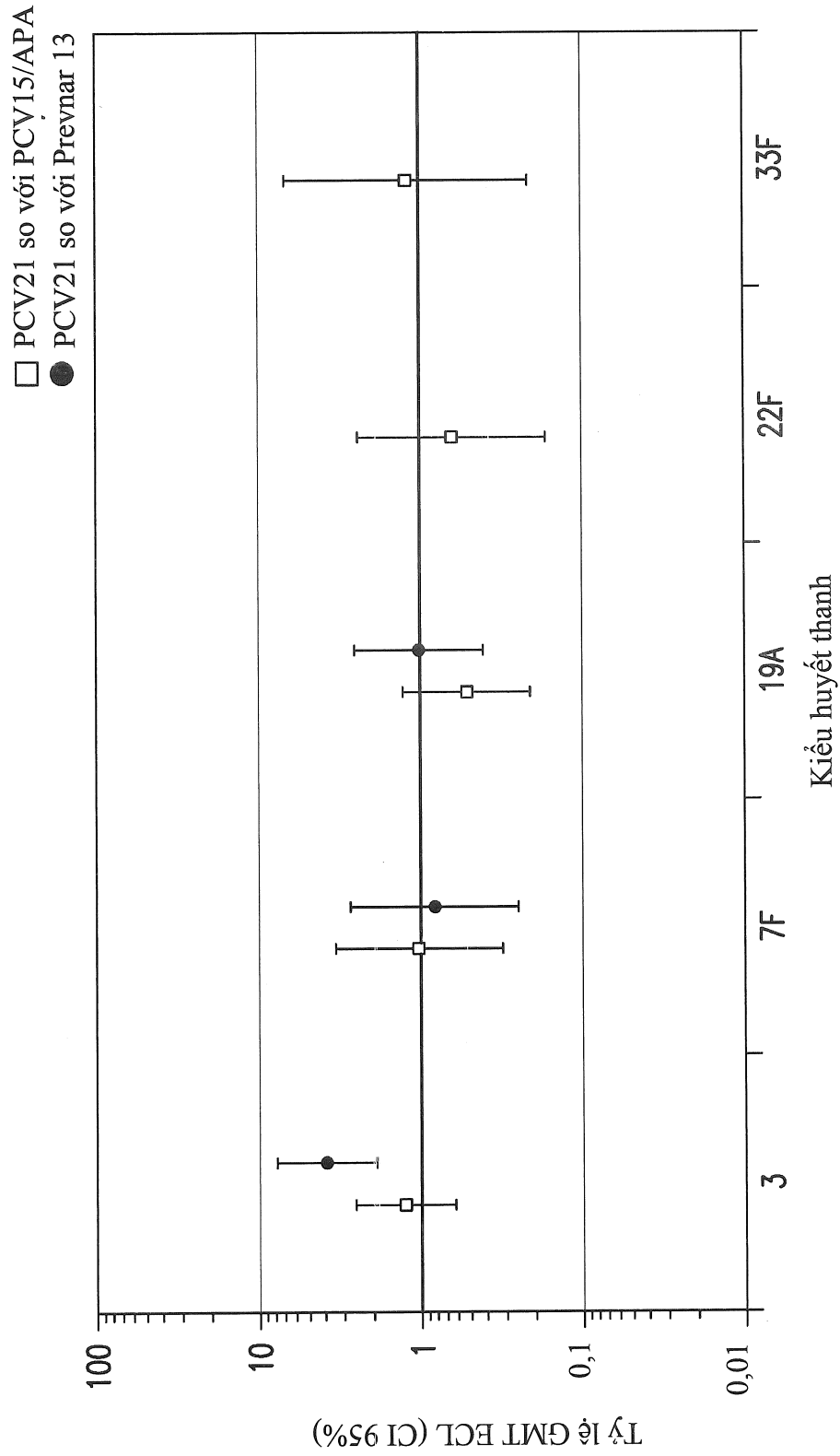
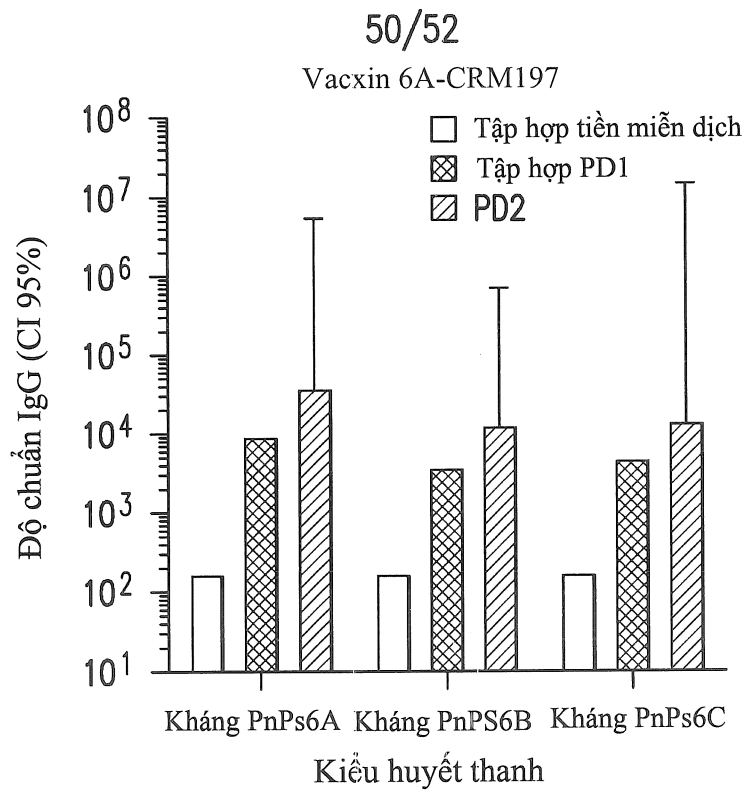
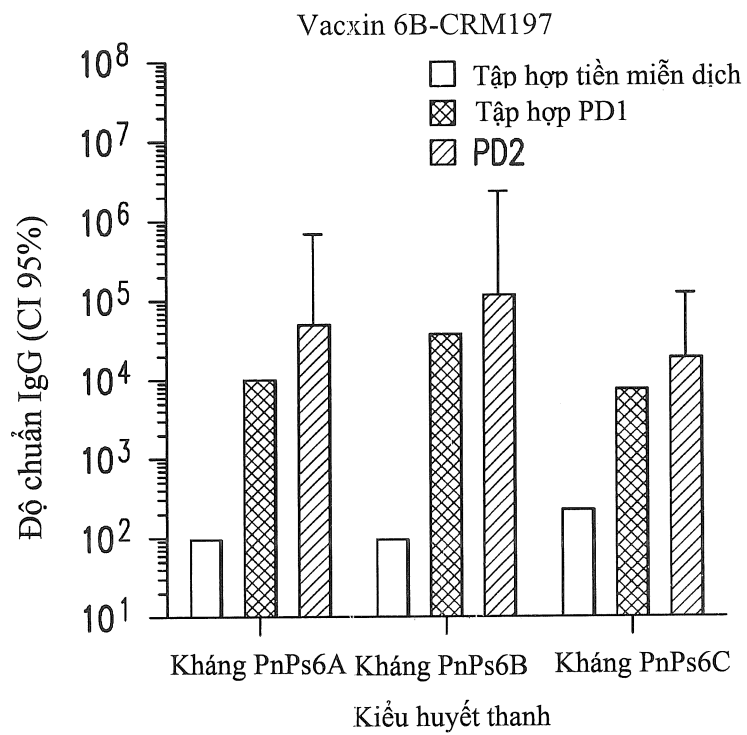


Fig.36

**Fig.37A****Fig.37B**

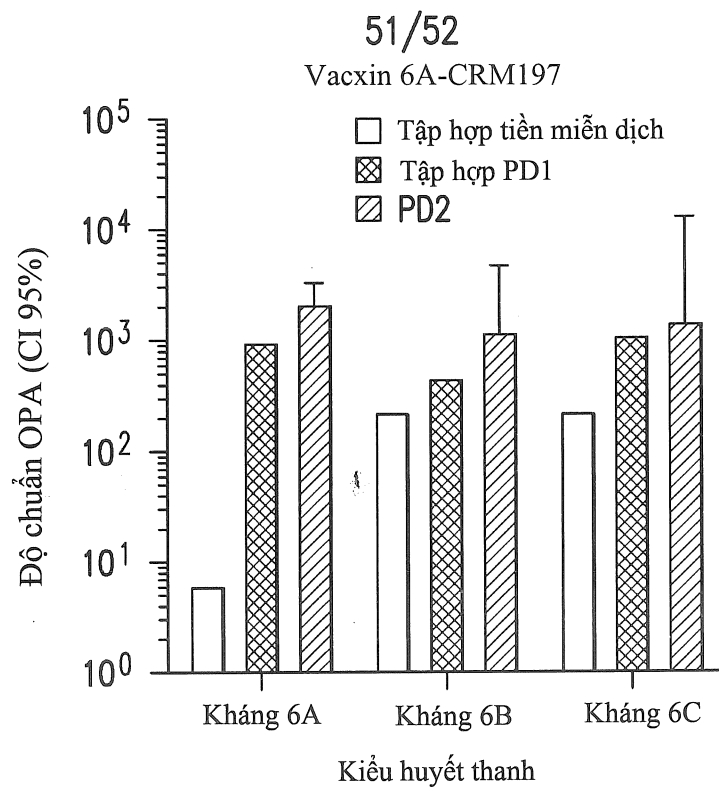


Fig.38A

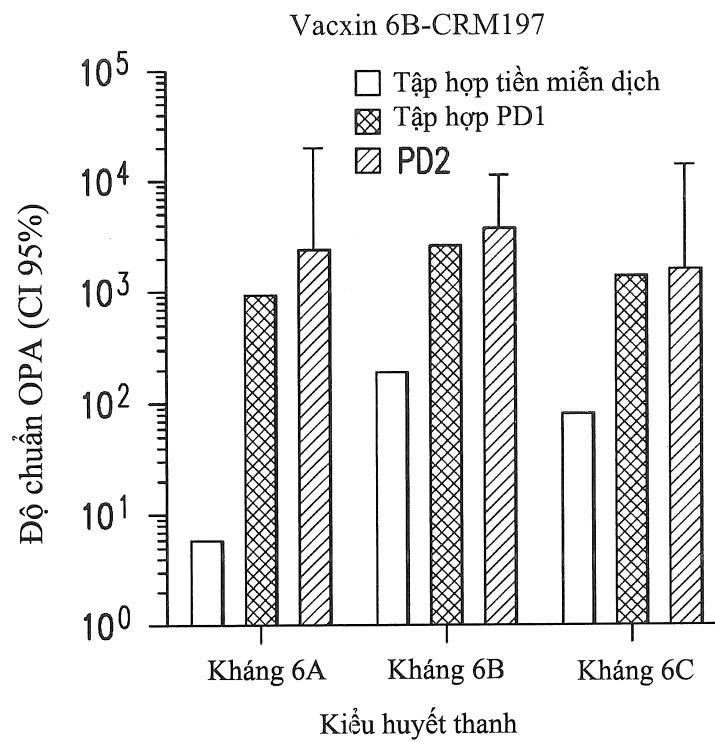
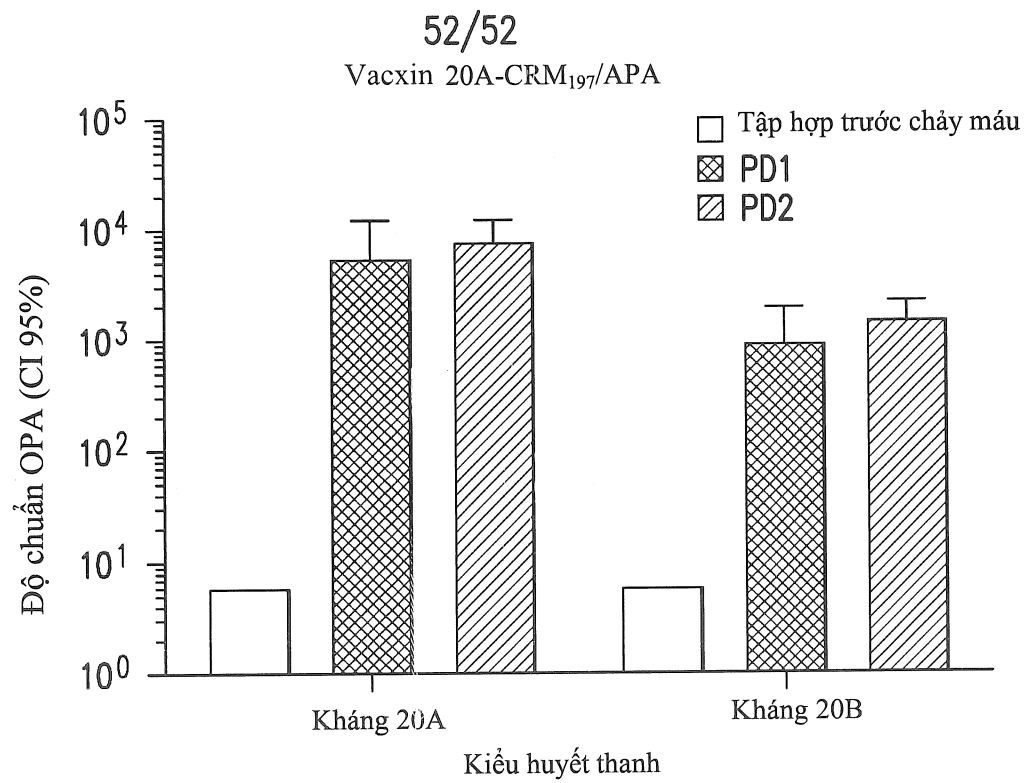
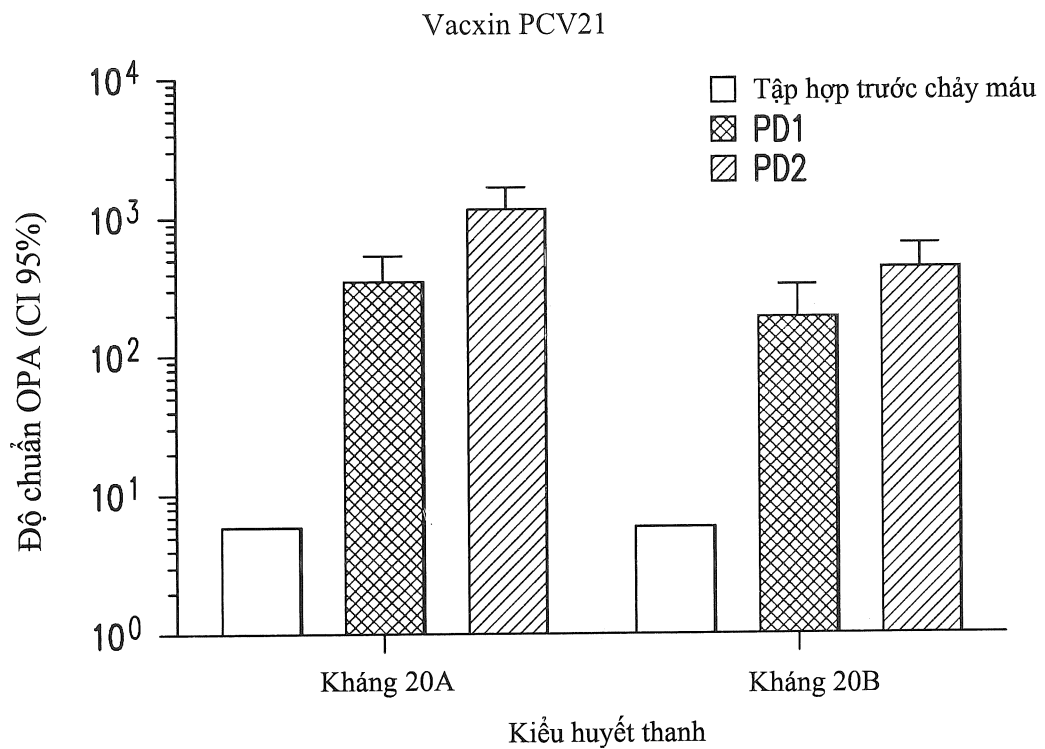


Fig.38A

**Fig.39A****Fig.39B**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Merck Sharp & Dohme Corp.
 Smith, William J.
 McHugh, Patrick
 Winters, Michael Albert
 Skinner, Julie M.
 He, Jian
 Musey, Luwy
 Abeygunawardana, Chitrananda
 Cui, Yadong Adam
 Kosinski, Michael J.
- <120> CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH ĐA HÓA TRỊ CHỨA THỂ LIÊN HỢP POLYSACARIT
 PROTEIN MANG STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
- <130> 24534-WO-PCT
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
 <223> Biến thể CRM197 của độc tính diphtheria
- <400> 1
- Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15
- Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30
- Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45
- Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
- Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val

65					70						75					80
Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Leu	Lys	Val	
				85					90					95		
Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	
			100					105					110			
Pro	Leu	Met	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Glu	Glu	Phe	Ile	Lys	Arg	Phe	Gly	
		115					120					125				
Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser	
	130					135					140					
Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	
145					150					155					160	
Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys	Arg	Gly	Gln	Asp	
				165					170					175		
Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val	Arg	
			180					185					190			
Arg	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Cys	Ile	Asn	Leu	Asp	Trp	Asp	Val	
		195					200					205				
Ile	Arg	Asp	Lys	Thr	Lys	Thr	Lys	Ile	Glu	Ser	Leu	Lys	Glu	His	Gly	
	210					215					220					
Pro	Ile	Lys	Asn	Lys	Met	Ser	Glu	Ser	Pro	Asn	Lys	Thr	Val	Ser	Glu	
225					230					235					240	
Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Tyr	Leu	Glu	Glu	Phe	His	Gln	Thr	Ala	Leu	Glu	
				245					250					255		
His	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Leu	Lys	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Asn	Pro	Val	
			260					265					270			

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
530 535