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

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

(11) **1-0052558**

(51)[2020.01] **A61K 39/09**; A61P 31/04

(13) **B**

(21) 1-2021-03977
(22) 17/12/2019
(86) PCT/US2019/066682 17/12/2019
(87) WO2020/131763 25/06/2020
(30) 62/781,835 19/12/2018 US; 62/853,331 28/05/2019 US
(45) 27/10/2025 451
(43) 27/12/2021 405A
(73) Merck Sharp & Dohme LLC (US)
126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065, United States of America
(72) ABEYGUNAWARDANA, Chitrananda (US); CUI, Yadong Adam (US); FERRERO, Romulo (US); HE, Jian (US); MUSEY, Luwy (US); PETIGARA, Tanaz (US); SKINNER, Julie, M. (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

(21) 1-2021-03977

(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* được được xác định trong bản mô tả này. 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.

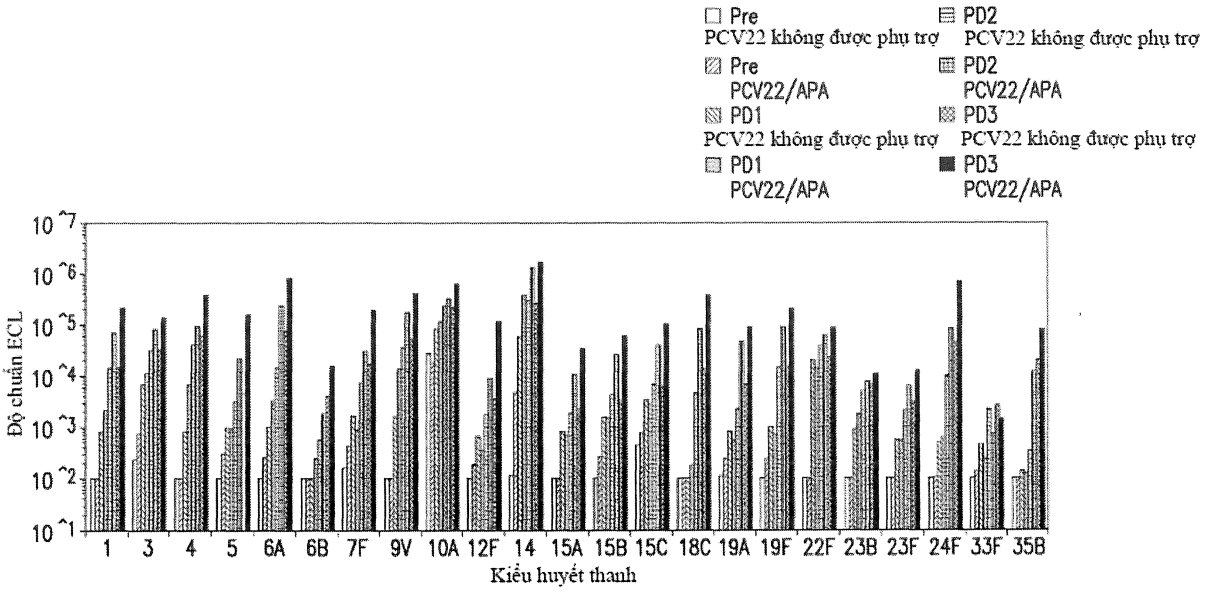

FIG.1

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 polysacarit-protein riêng biệt. Mỗi thể liên hợp này gồm có polysacarit 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.

Đơn này chứa danh mục trình tự được nộp điện tử ở dạng ASCII và được kết hợp toàn bộ nội dung vào trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Bản sao ASCII này, được tạo ra vào ngày 03 tháng 12 năm 2019, với tên là 24683WOPCT-SEQTXT-03DEC2019 và có dung lượng là 6 kilobyte.

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 polysacarit 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 bổ thể, mà bản thân nó còn mang tính miễn dịch kém. Polysacarit 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.

Vacxin polysacarit 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 polysacarit phế cầu khuẩn không liên hợp. Vacxin 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 vacxin liên hợp polysacarit-protein phế 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 vacxin liên hợp polysacarit-protein phế 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 vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị hiện có có hiệu quả trong việc làm giảm tỷ lệ mắc bệnh do phế cầu khuẩn liên quan đến các kiểu huyết thanh có trong các vacxin này. Tuy nhiên, đã gia tăng tỷ lệ hiện hành bệnh của các kiểu huyết thanh biểu thị phế cầu khuẩn không có trong các vacxin hiện có bán. Theo đó, có nhu cầu về các chế phẩm vacxin phế cầu khuẩn khác nữa mà có thể mang lại sự bảo vệ chống lại các kiểu huyết thanh phế 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 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, và trong đó thể liên hợp polysacarit protein bao gồm các polysacarit của nhóm các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm gồm:

a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

f) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

g) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

h) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

j) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

k) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

l) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

m) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

n) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

o) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

p) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

q) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

r) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

s) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

t) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

u) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

v) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

w) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

x) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

y) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

z) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B; và

aa) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B.

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 22 thể liên hợp polysacarit protein riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit dạng nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó polysacarit được điều chế từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 1, 3,

4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B.

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 22 thể liên hợp polysacarit protein riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, và trong đó thể liên hợp polysacarit protein bao gồm các polysacarit của nhóm các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm bao gồm: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B .

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 23 thể liên hợp polysacarit protein riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit dạng nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó polysacarit được điều chế từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B.

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 23 thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit dạng nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó mỗi thể liên hợp polysacarit protein riêng biệt bao gồm polysacarit từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B, tương ứng, và trong đó protein mang là CRM197.

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 24 thể liên hợp polysacarit protein riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit dạng nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó polysacarit được điều chế từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B.

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 24 thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit dạng nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó mỗi thể liên hợp polysacarit protein riêng biệt chứa polysacarit

từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B, tương ứng, và trong đó protein mang là CRM197.

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 24 thể liên hợp polysacarit protein riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit dạng nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó polysacarit được điều chế từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B.

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 24 thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit dạng nang từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, trong đó mỗi thể liên hợp polysacarit protein riêng biệt bao gồm polysacarit từ các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B, tương ứng, và trong đó protein mang là CRM197.

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa lên đến 33 thể liên hợp polysacarit protein riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, và trong đó thể liên hợp polysacarit protein bao gồm polysacarit của nhóm các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm gồm: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B, còn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám hoặc chín kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bổ sung được chọn từ 7C, 9N, 16F, 21, 23A, 31, 34, 35F và 38 .

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa lên đến 30 thể liên hợp polysacarit protein riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, và trong đó thể liên hợp polysacarit protein bao gồm polysacarit của nhóm các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm gồm: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B, còn bao gồm một, hai,

ba, bốn, năm hoặc sáu kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bổ sung được chọn từ 7C, 9N, 16F, 23A, 35F và 38.

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa lên đến 33 thể liên hợp polysacarit protein riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, và trong đó thể liên hợp polysacarit protein bao gồm polysacarit của nhóm các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm gồm: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B, còn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám hoặc chín kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bổ sung được chọn từ 7C, 9N, 16F, 21, 23A, 31, 34, 35F và 38 .

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa lên đến 30 thể liên hợp polysacarit protein riêng biệt, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp này chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, và trong đó thể liên hợp polysacarit protein bao gồm polysacarit của nhóm các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm gồm: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B, còn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* bổ sung được chọn từ 7C, 9N, 16F, 23A, 35F và 38.

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, dimetylsulfoxit (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, ví dụ, (DMSO).

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 vacxin 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 vacxin 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 vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị theo trình tự bất kỳ. Theo

các phương án cụ thể, vacxin 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, vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị gồm có các polysacarit nang không liên hợp.

Sáng chế cũng đề xuất 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 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. Các độ chuẩn pha loãng kháng thể IgG của tiền miễn dịch (Pre), sau liều 1 (PD1), 2 (PD2) và 3 (PD3) như được xác định bằng ECL đối với chuột nhắt được tạo miễn dịch bằng PCV22 không được phụ trợ (PCV22 không phụ trợ) hoặc được bào chế với chất phụ trợ nhôm phosphat (PCV22/APA). Đọc từ trái sang phải; Pre PCV22 không được phụ trợ, Pre PCV22/APA, PD1 PCV22 không được phụ trợ, PD1 PCV22/APA, PD2 PCV22 không được phụ trợ, PD2 PCV22/APA, PD3 PCV22 không được phụ trợ và PD3 PCV22/APA.

FIG.2. Tỷ lệ độ chuẩn pha loãng ECL của PCV22/APA so với PCV22 không được phụ trợ (PCV22 không phụ trợ) tại PD3.

FIG.3. Các độ chuẩn pha loãng OPA đặc hiệu kiểu huyết thanh (tiền miễn dịch, PD1, PD2, PD3) cho chuột nhắt được tạo miễn dịch bằng PCV22 không được phụ trợ (PCV22 không phụ trợ) hoặc được bào chế với APA (PCV22/APA). Đọc từ trái sang phải; Pre PCV22 không được phụ trợ, Pre PCV22/APA, PD1 PCV22 không được phụ trợ, PD1 PCV22/APA, PD2 PCV22 không được phụ trợ, PD2 PCV22/APA, PD3 PCV22 không được phụ trợ và PD3 PCV22/APA.

FIG.4. Tỷ lệ độ chuẩn pha loãng OPA của PCV22/APA so với PCV22 không được phụ trợ (PCV22 không phụ trợ) tại PD3.

FIG.5. Chuột nhắt được tạo miễn dịch PCV22 được bảo vệ khỏi thách thức nội khí quản *S. pneumoniae* 24F.

FIG.6. Các độ chuẩn pha loãng kháng thể IgG của tiền miễn dịch (Pre), PD1 và PD2 như được xác định bằng ECL đối với thỏ được tạo miễn dịch bằng PCV22 không được phụ trợ hoặc PCV22/APA. Các thanh lỗi thể hiện khoảng tin cậy 95% (CI) của độ chuẩn trung bình hình học (GMT). Đọc từ trái sang phải; Pre PCV22 không được phụ trợ, Pre PCV22/APA, PD1 PCV22 không được phụ trợ, PD1 PCV22/APA, PD2 PCV22 không được phụ trợ và PD2 PCV22/APA.

FIG.7. Tỷ lệ ECL GMT của PCV22/APA so với PCV22 không được phụ trợ tại PD2. Các thanh lỗi thể hiện khoảng tin cậy (CI) 95%.

FIG.8. Các độ chuẩn pha loãng OPA đặc hiệu của kiểu huyết thanh (tiền miễn dịch "Pre" và PD2) đối với thỏ được tạo miễn dịch bằng PCV22 không được phụ trợ hoặc PCV22/APA. Các thanh lỗi thể hiện sự thay đổi về độ chuẩn kháng thể chức năng cho năm con thỏ.

FIG.9. Các độ chuẩn pha loãng kháng thể IgG tiền miễn dịch (Pre), PD1, PD2 và PD3 được xác định bởi ECL đối với các IRM được tạo miễn dịch bằng A) PCV23 không được phụ trợ, B) PCV23 (DMSO)/APA, C) PCV23 (DMSO + Aq)/APA và D) PCV15/APA + PCV8/APA. Các thanh lỗi thể hiện khoảng tin cậy 95% (CI) của độ chuẩn trung bình hình học (GMT).

FIG.10. So sánh đáp ứng kháng thể ECL trong IRM (8-9 với mỗi nhóm) sau khi tiêm vacxin PCV23 có hoặc không có APA. Các ký hiệu chỉ ra tỷ lệ tại A) PD1, B) PD2, hoặc C) PD3. Tỷ lệ GMT với thanh lỗi thể hiện CI 95%.

FIG.11. So sánh đáp ứng kháng thể ECL trong IRM (9 với mỗi nhóm) sau khi tiêm vacxin PCV23 (DMSO + Aq)/APA hoặc dùng đồng thời với PCV15/APA + PCV8/APA. Các ký hiệu thể hiện tỷ lệ tại A) PD1, B) PD2 và C) PD3. Tỷ lệ GMT với thanh lỗi thể hiện CI 95%.

FIG.12. So sánh đáp ứng kháng thể ECL được tăng cường trong IRM (8-9 với mỗi nhóm) sau khi tiêm vacxin PCV23 không được phụ trợ, PCV23(DMSO)/APA, PCV23(DMSO + Aq)/APA hoặc PCV15/APA + PCV8/APA. A) PD1/Pre, B) PD2/Pre, C) PD3/Pre, D) PD2/PD1 và E) PD3/PD2. Các ký hiệu là tỷ lệ GMT với các thanh lỗi đại diện cho 95% CI.

FIG.13. (A) Các độ chuẩn pha loãng kháng thể IgG của tiền miễn dịch (Pre), sau liều 1 (PD1) và 2 (PD2) được xác định bởi ECL đối với thỏ trắng New Zealand được tạo miễn dịch bằng PCV24 được bào chế với tá dược nhôm phosphat (PCV24/APA). Các thanh lỗi thể hiện khoảng tin cậy 95% (CI) của độ chuẩn trung bình hình học (GMT). (B) Các độ chuẩn pha loãng OPA đặc hiệu kiểu huyết thanh (tiền miễn dịch và PD2) cho NZWR được tạo miễn dịch bằng PCV24/APA. Các thanh lỗi đại diện cho sự thay đổi trong các độ chuẩn kháng thể chức năng cho tám NZWR.

FIG.14. (A) Các độ chuẩn pha loãng kháng thể IgG của tiền miễn dịch (Pre), sau liều 1 (PD1), 2 (PD2) và 3 (PD3) như được xác định bởi ECL đối với khỉ Rhesus mới sinh (IRM) được tạo miễn dịch bằng PCV24 được bào chề với chất phụ trợ nhôm phosphat (PCV24/APA). Các thanh lỗi thể hiện khoảng tin cậy 95% (CI) của độ chuẩn trung bình hình học (GMT). (B) Các độ chuẩn pha loãng OPA đặc hiệu của kiểu huyết thanh (tiền miễn dịch và PD3) cho các IRM được tạo miễn dịch bằng PCV24/APA. Các thanh lỗi thể hiện sự thay đổi về độ chuẩn kháng thể chức năng cho năm IRM.

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, sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 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, và trong đó các thể liên hợp polysacarit protein bao gồm các polysacarit của nhóm các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm gồm:

a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

f) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

g) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

h) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

j) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

k) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

l) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

m) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

n) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

o) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

p) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

q) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

r) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

s) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

t) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

u) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

v) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

w) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

x) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

y) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

z) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

aa) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

bb) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

cc) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

dd) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

ee) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

ff) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

gg) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

hh) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

ii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

jj) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

kk) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

ll) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

mm) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

nn) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

oo) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

pp) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

qq) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

rr) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

ss) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

tt) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

uu) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

vv) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

ww) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

xx) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

yy) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

zz) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

aaa) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39; và

bbb) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39.

Theo một số phương án, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa các kiểu huyết thanh phế cầu khuẩn được chọn từ nhóm gồm: i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B; hoặc ii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B; hoặc iii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B; hoặc iv) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* 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* chứa các kiểu huyết thanh: i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B; hoặc ii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B; hoặc iii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B. Các chế phẩm này được phát hiện là có khả năng sinh miễn dịch ở chuột, thỏ và/hoặc khỉ và tạo ra kháng thể chức năng tiêu diệt các chủng vi khuẩn loại vacxin ở tất cả các liều được thử nghiệm.

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 vacxin và/hoặc là một phần của chế độ điều trị với (các) vacxin phế 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 vacxin phế 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 vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị khác.

Theo các phương án của sáng chế, các thể liên hợp từ ít nhất một kiểu huyết thanh phế 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 phế cầu khuẩn mà mỗi thể liên hợp này được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic. 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	dimetylsulfoxit
DS	dược 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
IRM	khỉ rezut mới sinh
LOS	lipo-oligosaccarit
LPS	lipopolysacarit
MALS	tán xạ ánh sáng nhiều lớp
MBC	thể liên hợp khối hóa trị một
Mn	khối lượng phân tử trung bình số

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
PD3	sau liều 3
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 vacxin 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*.

“Vacxin 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 vacxin miễn dịch và vacxin 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.

Thuật ngữ "không được phụ trợ", trong ngữ cảnh của vacxin hoặc chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế, có nghĩa là chế phẩm polysacarit phế cầu khuẩn, bao gồm nhưng không giới hạn ở PCV8, PCV15, PCV22, PCV23 và PCV24, trong đó chế phẩm này không chứa chất phụ trợ.

"PCV8" dùng để chỉ chế phẩm sinh miễn dịch chứa các kiểu huyết thanh polysacarit *S. pneumoniae* (PnPs) -8, -10A, -12F, -15A, -15C, -23B, -24F và -35B.

"PCV15" dùng để chỉ chế phẩm sinh miễn dịch chứa các kiểu huyết thanh polysacarit *S. pneumoniae* (PnPs) -1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -9V, -14, -18C, -19A, -19F, -22F, -23F và -33F.

"PCV22" dùng để chỉ chế phẩm sinh miễn dịch chứa các kiểu huyết thanh polysacarit *S. pneumoniae* (PnPs) -1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -9V, -10A, -12F, -14, -15A, -15C, -18C, -19A, -19F, -22F, -23B, -23F, -24F, -33F và -35B.

"PCV23" dùng để chỉ chế phẩm sinh miễn dịch chứa các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* polysacarit (PnPs) -1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -8, -9V, -10A, -12F, -14, -15A, -15C, -18C, -19A, -19F, -22F, -23B, -23F, -24F, -33F và -35B.

"PCV24" dùng để chỉ chế phẩm sinh miễn dịch chứa các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* polysacarit (PnPs) -1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -8, -9V, -10A, -11A, -12F, -14, -15A, -15C, -18C, -19A, -19F, -22F, -23B, -23F, -24F, -33F và -35B.

"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 vacxin 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 polysacarit protein *S. pneumoniae* trong chế phẩm, (b) phân tử lượng trung bình trọng số (Mw) của thể liên hợp polysacarit 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 phế 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: i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B hoặc ii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B hoặc iii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B. Theo các phương án phụ của phương án E1, chế phẩm sinh miễn dịch không chứa thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae* khác bất kỳ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, polysacarit phế cầu khuẩn kiểu huyết thanh 15B được khử O-axetyl (DeOAc15B) về cơ bản tương đương với polysacarit phế cầu kiểu huyết thanh 15C và có phổ NMR về cơ bản giống hệt nhau (dữ liệu không được

thể hiện). Như được sử dụng trong bản mô tả này, mỗi polysacarit phế cầu khuẩn kiểu huyết thanh 15B được khử O-axetyl và polysacarit phế cầu khuẩn kiểu huyết thanh 15C có thể có hàm lượng O-axetyl với mỗi đơn vị lặp lại trong khoảng 0-5%, hoặc trong khoảng 0-4%, hoặc trong khoảng 0-3%, hoặc trong khoảng 0-2%, hoặc trong khoảng 0-1%, hoặc trong khoảng 0-0,5%, hoặc trong khoảng 0-0,1%, hoặc không có hàm lượng O-axetyl. Trong báo cáo của Spencer B.L. et al., polysacarit phế cầu khuẩn 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 (DeOAc15B) 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 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 phương án E1 và phương án phụ bất kỳ của chúng, chế phẩm này còn chứa chất mang dược dụng.

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, sáng chế đề xuất 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, sáng chế đề xuất 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

6B, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 6B của *S. pneumoniae* tạo ra sự bảo vệ chéo kháng các kiểu huyết thanh 6A và/hoặc 6C của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất 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, sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa thể liên hợp polysacarit protein *S. pneumoniae*, trong đó mỗi thể liên hợp bao gồm polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae*, bao gồm kiểu huyết thanh 15B, được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh 15B của *S. pneumoniae* cung cấp sự bảo vệ chéo chống lại kiểu huyết thanh 15C 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 HGTKPGYVDS IQKGIQKPKS GTQGNYDDDW
KEFYSTDNKY DAAGYSVDNE NPLSGKAGGV VKVTYPGLTK VLALKVDNAE
TIKKELGLSL TEPLMEQVGT EEFIKRFGDG ASRVVLSLPF AEGSSSVEYI
NNWEQAKALS VELEINFETR GKRGQDAMYE YMAQACAGNR VRRSVGSSLS
CINLDWDVIR DKTKTKIESL KEHGPIKNKM SESPNKTVSE EKAKQYLEEF
HQTALEHPEL SELKTVTGTN 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 (β197) 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 siêu lọc,

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 (toxoit bạch hầu) hoặc mảnh B của DT (DTFB), TT (toxit uốn ván) hoặc mảnh C của TT, toxoit ho gà, toxoit 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 màng ngoài (OMPC), porin, protein gắn kết transferin, 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 Nicholls và Youle mô tả trong 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 US 4,709,017 hoặc US 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 US 5,917,017 hoặc số U.S. 6,455,673; hoặc mảnh được bộc lộ trong tài liệu US 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 E1 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, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 hoặc hơn, khi áp dụng) kiểu huyết thanh polysacarit được liên hợp với CRM197. Theo các phương án khác của sáng chế, bao gồm phương án E1 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 đệm, 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) Montanit 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) lipopolysacarit 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]etyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamino]-ß-D-glucopyranosit, còn được biết đến là 529 (trước đây được biết đến là RC529), được phối trộn dưới dạng dạng chứa nước hoặc dưới dạng nhũ tương tổng hợp

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

(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 trở 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-axetylmuramyl-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 vacxin được kết tủa alum hoặc vacxin 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 phương án, liều lượng của muối nhôm là 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 125, 150, 200, 300, 500, hoặc 700 µg, hoặc 1, 1,2, 1,5, 2, 3, 5 mg hoặc hơn. Theo một phương án khác, liều lượng muối alum được mô tả ở trên là với mỗi µg protein tái tổ hợp.

Theo một số phương án, $Al(OH)_3$ 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 200µg 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 4µg/mL đối với tất cả các kiểu huyết thanh ngoại trừ 6B, kiểu huyết thanh này được pha loãng đến mục tiêu là 8µg/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 250µg/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 polysacarit protein *S. pneumoniae* như được mô tả ở đây, ví dụ, theo phương án E1 hoặc phương án phụ bất kỳ của chúng, và không chứa chất phụ trợ.

Dược phẩm

Các chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế có thể được phối trộn dưới dạng lọ chứa một liều duy nhất, lọ chứa nhiều liều hoặc dưới dạng xi lanh thủy tinh hoặc nhựa được làm đầy từ trước.

Theo phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị 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 dược dụng 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 etyl 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.

Các chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế 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, $CaCl_2$, KCl và $MgCl_2$. 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 dược dụng 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, sucxinat 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 sucxinic và axit tartric, 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 dược 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 hướng hương, dầu gan cá, dầu cá khác, hoặc lipit 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: Poloxamer -188 (P188; Pluoronic; F68 NF), 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-l,2-etandiyl) 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 stearylic và rượu oleylic (còn được biết đến là chất hoạt động bề mặt Brij), như trietylenglycol 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% 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). 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, 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.

Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị PCV24 được điều chế bằng cách liên hợp riêng rẽ protein CRM197 với các kiểu huyết thanh polysacarit *S. pneumoniae* (PnPs) -1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -8, -9V, - 10A, -11A, -12F, -14, -15A, -15C, -18C, -19A, -19F, -22F, -23B, -23F, -24F, -33F và -35B sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (còn được gọi là hóa học DMSO) và được phối trộn trong L-Histidin 20 mM độ pH 5,8, NaCl 150 mM và polysorbat 20 (PS-20) 0,1% trọng lượng/thể tích ở 4 µg/mL hoặc 8 µg/mL của mỗi kiểu huyết thanh polysacarit cho tổng nồng độ polysacarit tương ứng là 96 µg/mL hoặc 192 µg/mL, và được gọi là "PCV24 không được phụ trợ". Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị PCV24 được điều chế trong L-Histidin 20 mM độ pH 5,8, NaCl 150 mM và polysorbat 20 (PS-20) 0,2% trọng lượng/thể tích ở 4 µg/mL của mỗi kiểu huyết thanh polysacarit đối với tổng nồng độ polysacarit là 96 µg/mL còn chứa 250 µg [Al]/mL ở dạng chất phụ trợ nhôm phosphat. Nó được gọi là "PCV24/APA".

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: $HO(C_2H_4O)_a(C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_aH$, 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, sucxinat, HEPES (4-(axit 2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonic), 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, sucxinat, 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. Theo một phương án, nồng độ của chất đệm sẽ nằm trong khoảng từ 1 mM đến 100 mM. Theo phương án khác, nồng độ của chất đệm sẽ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 80 mM. Theo phương án khác, nồng độ của chất đệm sẽ nằm trong khoảng từ 1 mM đến 50 mM, hoặc 5 mM đến 50 mM. Theo một số khía cạnh nhất định, chất đệm là histidin ở nồng độ cuối cùng từ 5 mM đến 50 mM, hoặc succinat ở nồng độ cuối cùng từ 1 mM đến 10 mM. Theo một số khía cạnh nhất định, chất đệm histidin có nồng độ cuối cùng là 20 mM ± 2 mM.

Trong khi dung dịch nước muối (ví dụ, 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 giới hạn ở sucroza, trehaloza, mannitol, 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 20 mM đến 500 mM hoặc từ 40 mM đến 170 mM. Theo một khía cạnh, nước muối là NaCl, tùy ý có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 25 mM đến 170 mM.

Theo một phương án được ưu tiên, dược phẩm chứa chất đệm 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 chế phẩm 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 phế cầu khuẩn. Nhìn chung, đối với các thể liên hợp gốc polysacarit, mỗi liều sẽ chứa từ 0,08 đến 100 μg 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 μg. Theo các phương án khác, liều của mỗi thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 5 μg, nằm trong khoảng từ 0,4 đến 4 μg, nằm trong khoảng từ 0,4 đến 3 μg, nằm trong khoảng từ 0,4 đến 2 μg, hoặc nằm trong khoảng từ 0,4 đến 1 μg. Theo một số phương án, liều của một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit là 100, 150, 200, 250, 300,

400, 500, hoặc 750 ng 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 µg.

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 chế phẩm sinh miễn dịch 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 phương án khác, liều lượng tiêm chủng cho người được xác định bằng cách ngoại suy từ nghiên cứu trên động vật sang dữ liệu ở người. Theo phương án khác, liều lượng này được xác định theo kinh nghiệm.

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 siêu lọc. 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-hydroxysucxinimit 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 phế 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. 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 pyrolidin-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 pyrolidin-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-

lodosucxinimit, 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, sulfit, bisulfat, dithionit, metabisulfit, 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 dimetylsulfoxit (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 ight 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; hoặc 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 (dimetylformamit). 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 triaxetoxyborohydrua 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, dimetylamin-boran, t-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 cô/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-piperazinetansulfonic), Bis-tris, ADA (axit N-(2-Axetamido)iminodiaxetic), 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 *S. pneumoniae*: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B. 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 *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B được điều chế bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic. Theo một số phương án, mỗi một trong các thể liên hợp trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được điều chế 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 theo sáng chế được liên hợp với protein mang 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 theo sáng chế được liên hợp với protein mang 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, hai mươi mốt hoặc nhiều hơn hai mươi mốt, hai mươi ba hoặc nhiều hơn hai mươi ba, hoặc hai mươi bốn hoặc nhiều hơn hai mươi bốn kiểu huyết thanh trong chế phẩm đa hóa trị theo sáng chế được liên hợp với protein mang bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic. Theo một số phương án, polysacarit từ một hoặc nhiều kiểu huyết thanh trong chế phẩm đa hóa trị theo sáng chế được liên hợp với protein mang bằng cách sử dụng các hóa chất khác có thể có 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* 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 *S. pneumoniae* từ một hoặc nhiều thể liên hợp polysacarit protein được liên hợp với protein mang 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% kiểu huyết thanh phế cầu khuẩn trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị được liên hợp trong dung môi aprotic. Phần còn lại của các kiểu huyết thanh được liên hợp 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).

Theo một số phương án của sáng chế, tổng nồng độ polysacarit trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 0,02 đến khoảng 0,288 mg/mL. Theo một số phương án của sáng chế, tổng nồng độ polysacarit trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 0,03 đến 0,192 mg/mL. Theo một số phương án của sáng chế, tổng nồng độ polysacarit trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 0,04 đến khoảng 0,192 mg/mL. Theo các phương án khác, tổng nồng độ polysacarit trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 0,065 đến khoảng 0,096 mg/mL, khoảng 0,070 đến khoảng 0,080 mg/mL, khoảng 0,065 đến khoảng 0,080 mg/mL, khoảng 0,070 đến khoảng 0,085 mg/mL, khoảng 0,110 đến khoảng 0,128 mg/mL, khoảng 0,110 đến khoảng 0,175 mg/mL, khoảng 0,10 đến khoảng 0,175 mg/mL, khoảng 0,110 đến khoảng 0,170 mg/mL, khoảng 0,115 đến khoảng 0,15 mg/mL, khoảng 0,110 đến khoảng 0,15 mg/mL, khoảng 0,110 đến khoảng 0,125 mg/mL, khoảng 0,150 đến khoảng 0,170 mg/mL, khoảng 0,150 đến khoảng 0,165 mg/mL, khoảng 0,140 đến khoảng 0,170 mg/mL, khoảng 0,130 đến khoảng 0,170 mg/mL, khoảng 0,150 đến khoảng 0,175 mg/mL, khoảng 0,070 đến khoảng 0,170 mg/mL, khoảng 0,065 đến khoảng 0,175 mg/mL, hoặc khoảng 0,065 đến khoảng 0,180 mg/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 2000 đến khoảng 6500 kDa, từ khoảng 2500 đến khoảng 6000 kDa, từ khoảng 3000 đến khoảng 5500 kDa, từ khoảng 3500 đến khoảng 5000 kDa, từ khoảng 3500 đến khoảng 4500 kDa, từ khoảng 3500 đến khoảng 4700 kDa, từ khoảng 3500 đến khoảng 4600 kDa, từ khoảng 3500 đến khoảng 4500 kDa, từ khoảng 3500 đến khoảng 4400 kDa, từ khoảng 3500 đến khoảng 4300 kDa, từ khoảng 3500 đến khoảng 4200 kDa, từ khoảng 3600 đến khoảng 4700 kDa, từ khoảng 3600 đến khoảng 4600 kDa, từ khoảng 3600 đến khoảng 4500 kDa, từ khoảng 3600 đến khoảng 4400 kDa, từ khoảng 3600 đến khoảng 4300 kDa, từ khoảng 3600 đến khoảng 4200 kDa, từ khoảng 3700 đến khoảng 4700 kDa, từ khoảng 3700 đến khoảng 4600 kDa, từ khoảng 3700 đến khoảng 4500 kDa, từ khoảng 3700 đến khoảng 4400 kDa, từ khoảng 3700 đến khoảng 4300 kDa, từ khoảng 3700 đến khoảng 4200 kDa, từ khoảng 3800 đến khoảng 4700 kDa, từ khoảng 3800 đến khoảng 4600 kDa, từ khoảng 3800 đến khoảng 4500 kDa, từ khoảng 3800 đến khoảng 4400 kDa, từ khoảng 3800 đến khoảng 4300 kDa, từ khoảng 3800 đến khoảng 4200 kDa, từ khoảng 3900 đến khoảng 4700 kDa, từ khoảng 3900 đến khoảng 4600 kDa, từ khoảng 3900 đến khoảng 4500 kDa, từ khoảng 3900 đến khoảng 4400 kDa, từ khoảng 3900 đến khoảng 4300 kDa, hoặc từ khoảng 3900 đến khoảng 4200 kDa.

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. 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 polysacarit 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 polysacarit, 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 polysacarit-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 polysacarit 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 polysacarit 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 cụ thể 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. Cơ chế sinh miễn dịch gia tăng có thể có 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-dimetylamino pyridini tetrafloborat (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-sucxinimidyl 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 liên hợp thích hợp khác sử dụng carbodiimit, hydrazua, este hoạt tính, norboran, axit p-nitrobenzoic, N-hydroxysucxinimit, 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, siêu lọc, 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 có thể 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 phương án được ưu tiên, mức độ liên hợp, như được đo bằng mức tiêu thụ lysin của thể liên hợp glyco theo sáng chế nằm trong khoảng từ 2 đến 15, từ 2 đến 13, từ 2 đến 10, từ 2 đến 8, từ 2 đến 6, từ 2 đến 5, từ 2 đến 4, từ 3 đến 15, từ 3 đến 13, từ 3 đến 10, từ 3 đến 8, từ 3 đến 6, từ 3 đến 5, từ 3 đến 4, từ 5 đến 15, từ 5 đến 10, từ 8 đến 15, từ 8 đến 12, từ 10 đến 15 hoặc 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 polysacarit 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 saccarit với protein mang (w/w) 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 hại 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 polysacarit 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 polysacarit-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 mẫn 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 xuất phương pháp ngăn ngừa bệnh viêm phổi do phế cầu khuẩn và/hoặc bệnh do phế cầu khuẩn xâm lấn ở trẻ sơ sinh (dưới 1 tuổi), trẻ mới biết đi (khoảng 12 đến 24 tháng) hoặc trẻ nhỏ (khoảng 2 đến 5 năm).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa bệnh viêm phổi do phế cầu khuẩn và/hoặc bệnh do phế cầu khuẩn xâm lấn ở bệnh nhân từ 6 tuần đến 17 tuổi.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa bệnh viêm phổi do phế cầu khuẩn và/hoặc bệnh do phế cầu khuẩn xâm lấn ở bệnh nhân từ 6 tháng đến 17 tuổi.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa bệnh viêm phổi do phế cầu khuẩn và/hoặc bệnh do phế cầu khuẩn xâm lấn ở người lớn từ 18 tuổi trở lên.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa bệnh viêm phổi do phế cầu khuẩn và/hoặc bệnh do phế cầu khuẩn xâm lấn ở người lớn từ 50 tuổi trở lên.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa bệnh viêm phổi do phế cầu khuẩn và/hoặc bệnh do phế cầu khuẩn xâm lấn ở người lớn từ 65 tuổi trở lên.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa bệnh viêm phổi do phế cầu khuẩn và/hoặc bệnh do phế cầu khuẩn xâm lấn gây ra bởi một hoặc nhiều chủng *Streptococcus pneumoniae* sau đây: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 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 các kiểu huyết thanh: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B hoặc các kiểu huyết thanh: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A,

12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B. Theo phương án khác 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* gồm các kiểu huyết thanh: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B hoặc các kiểu huyết thanh: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 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 các kiểu huyết thanh: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B hoặc các kiểu huyết thanh: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B. Theo phương án khác 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* gồm các kiểu huyết thanh: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B hoặc các kiểu huyết thanh: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B. Theo một phương án trong số 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 các kiểu huyết thanh: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B. Theo phương án khác 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* gồm các kiểu huyết thanh: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B hoặc các kiểu huyết thanh:

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 phế cầu khuẩn của các kiểu huyết thanh 6A, 6B, và 6C.

Theo các phương án cụ thể của các phương pháp ở trên, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị bao gồm các thể liên hợp phế cầu khuẩn bao gồm các polysacarit của nhóm các kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm gồm:

a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;
b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;
c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;
d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;
e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;
f) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;
g) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;
h) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;
i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;
j) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;
k) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

l) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

m) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

n) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

o) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

p) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

q) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

r) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

s) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

t) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

u) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

v) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

w) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

x) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

y) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B;

z) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B; và

aa) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B.

Theo các phương án khác của 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 các kiểu huyết thanh: i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B; hoặc ii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B; hoặc iii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B ; hoặc iv) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B .

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:

bb) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

cc) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

dd) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

ee) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

ff) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

gg) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

hh) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

ii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

jj) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

kk) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

ll) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

mm) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

nn) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

oo) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

pp) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

qq) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

rr) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

ss) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

tt) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

uu) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

vv) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

ww) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

xx) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

yy) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

zz) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39;

aaa) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39; và

bbb) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B và 39.

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 thể liên hợp polysacarit kiểu huyết thanh 15C (hoặc 15B được khử O-axetyl), mà chứa thể liên hợp polysacarit 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 phế cầu khuẩn của các kiểu huyết thanh 15B và 15C (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 vacxin 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 vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị. Vacxin sinh miễn dịch đa hóa trị có thể là vacxin 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 các phương án cụ thể của phương pháp ở trên, bệnh nhân được điều trị từ trước bằng vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị mà được chỉ định để ngăn ngừa bệnh do phế cầu khuẩn gây ra bởi một hoặc nhiều kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* trong nhóm các kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm gồm:

i. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F và 23F;

ii. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, và 19A;

iii. 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F và 23F;

iv. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, và 33F;

v. 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

vi. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 10A, 11A, 12F và 15B.

Theo các phương án cụ thể của phương pháp ở trên, vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa nhiều thể liên hợp polysacarit protein, trong đó các thể liên hợp polysacarit protein chứa polysacarit từ kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang. Theo các phương án khác, vacxin 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 (vacxin 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 (vacxin 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™ (vacxin 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 vacxin 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 vacxin 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 vacxin 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 vacxin 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 vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị, theo trình tự bất kỳ. Ví dụ, trước tiên bệnh nhân được cho dùng vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị và sau đó bệnh nhân này được dùng chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Một cách thay thế, trước tiên bệnh nhân được cho dùng chế

phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế và sau đó được dùng vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị. Vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị có thể là vacxin 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 các 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 vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị được chỉ định để ngăn ngừa bệnh do phế cầu khuẩn gây ra bởi một hoặc nhiều kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* thuộc nhóm các kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm gồm:

i. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F và 23F;

ii. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, và 19A;

iii. 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F và 23F;

iv. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, và 33F;

v. 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

vi. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 10A, 11A, 12F và 15B.

Theo các phương án cụ thể của phương pháp ở trên, vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa polysacarit 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 các phương án cụ thể của phương pháp ở trên, vacxin 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, vacxin 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 (vacxin 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 (vacxin 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™ (vacxin 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 vacxin 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 vacxin 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 vacxin 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 vacxin 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 vacxin 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 theo sáng chế,

(2) đợi một khoảng thời gian định trước trôi qua, và

(3) cho bệnh nhân này dùng vacxin 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 vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị có thể là vacxin 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 vacxin 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 .

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 vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị có thể là vacxin 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, vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị 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. Theo các phương án thay thế, vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị chứa polysacarit 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 vacxin 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 vacxin 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 các 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).

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, bệnh nhân là trẻ sơ sinh (khoảng 6 tuần đến 12 tháng). Theo một số phương án, bệnh nhân là trẻ mới biết đi (khoảng 12 đến 24 tháng) hoặc trẻ nhỏ (khoảng 2 đến 5 tuổi). Các chế phẩm theo sáng chế cũng thích hợp để sử dụng cho trẻ lớn hơn, thanh thiếu niên và người lớn (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 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 từ 18 tuổi trở lên.

Theo các phương án khác của phương pháp theo sáng chế, bệnh nhân là trẻ sơ sinh và trẻ sơ sinh được cho dùng 1, 2 hoặc 3 liều chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế. Thời lượng giữa việc dùng mỗi liều có thể khác nhau, nhưng ví dụ về lịch dùng bao gồm việc dùng liều khi trẻ 2 tháng tuổi, sau đó sử dụng liều khác khi trẻ 4 tháng tuổi, và cuối cùng là dùng liều cuối cùng lúc 6 tháng tuổi. Ví dụ khác về lịch dùng ở trẻ sơ sinh là dùng liều ở 2 tháng tuổi và sau đó dùng liều khác khi trẻ được 3 tháng tuổi. Ví dụ khác về lịch dùng ở trẻ sơ sinh là dùng liều khi trẻ 2 tháng tuổi và sau đó dùng liều khác khi trẻ 3 tháng tuổi, và cuối cùng là dùng liều cuối cùng khi trẻ 6 tháng tuổi. Theo các phương án khác, bệnh nhân là trẻ sơ sinh có thể nhận được liều "tăng cường" bổ sung của chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế khi trẻ mới biết đi. Ví dụ, trẻ sơ sinh được dùng liều khi trẻ 2 tháng tuổi, sau đó dùng liều khác khi trẻ 4 tháng tuổi, và cuối cùng là liều cuối cùng khi trẻ được 6 tháng tuổi, sau đó, khi trẻ đến tuổi chập chững biết đi, liều "tăng cường" bổ sung của chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế được dùng trong khoảng thời gian từ 11 đến 15 tháng tuổi.

Theo một phương án, trẻ sơ sinh được dùng 2 liều chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế.

Theo một phương án, trẻ sơ sinh được dùng 3 liều chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế.

Theo một phương án, bệnh nhân được dùng 3 liều chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế, trong đó liều đầu tiên và liều thứ hai được dùng từ 2 đến 10 tháng tuổi và liều thứ ba được dùng từ 11 đến 15 tháng tuổi.

Theo một phương án, bệnh nhân được dùng 4 liều của chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo sáng chế, trong đó liều đầu tiên được dùng khi được 2 tháng tuổi, liều thứ hai được dùng khi được 4 tháng tuổi, liều thứ ba được dùng khi được 6 tháng tuổi và liều thứ tư được dùng từ 11 đến 15 tháng tuổi.

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 vacxin chống bệnh cúm. Theo một số phương án, vacxin cúm là "vacxin cúm bậc cao", một vacxin 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 polysacarit-protein phế cầu khuẩn sinh miễn dịch đa hóa trị được mô tả ở đây. Lượng tối ưu của các thành phần cho vacxin 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.

Các ví dụ sau minh họa, nhưng không giới hạn sáng chế.

Ví dụ 1

Tạo ra polysacarit 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 polysacarit 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 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F và 35B thu được từ Merck Culture Collection. Các chủng đối với các kiểu huyết thanh 23B thu được từ Trung tâm kiểm soát và ngăn ngừa bệnh tật và Đại học Alabama Birmingham. Các chủng đối với kiểu huyết thanh 24F thu được từ Bộ sưu tập giống cấy Merck và Đại học Alabama Birmingham. 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 bicacbonat, 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 polysacarit phế cầu khuẩn 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 siêu lọc, dịch chiết nấm men hoặc dịch chiết nấm men siêu lọc, HEPES, natri clorua, natri bicacbonat, 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. 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 siêu lọc, dịch chiết nấm men hoặc dịch chiết nấm men siêu lọc, 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 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 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 thẩm 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°C.

Ví dụ 3

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 1 cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) 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 siêu lọc. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong dimetylsulfoxit (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 siêu lọc 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 siêu lọc 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. 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 bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10 kDa sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5 kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5 kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 2,5 mg Ps/mL với nồng độ sucroza bằng 10% trọng lượng/thể tích. CRM197 được phối trộn để làm khô lạnh ở 6 mg 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 1,0 g 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 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 lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C trong 3 ngày với natri clorua 150 mM, 0,05% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, sử dụng catxet thẩm tách NMWCO 300 kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron), được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 4

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 1 cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. Sau đó CRM197 đã tinh chế được liên hợp với polysacarit hoạt hóa bằng cách sử dụng niken clorua trong hỗn hợp phản ứng, và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp siêu lọc 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 siêu lọc 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. Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 15 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc được thực hiện ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C. Bước siêu lọc 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 kết hợp với dung dịch polysacarit được đệm ở tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 0,5. 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 6,9 g/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 120 giờ 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 3,5 g/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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 100kDa. Mẻ, được thu hồi trong chất

thẩm tích, sau đó được pha loãng đến khoảng 2,0g polysacarit/L và độ pH được điều chỉnh bằng cách bổ sung natri bicacbonat 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 siêu lọc 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.

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 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20. Mẻ này được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 5

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 1 cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 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 siêu lọc. Sau đó CRM197 đã tinh chế được liên hợp với polysacarit hoạt hóa bằng cách sử dụng niken clorua trong hỗn hợp phản ứng, và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp siêu lọc 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 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 siêu lọc 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. Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 15 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 kết hợp với dung dịch polysacarit được đệm ở tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 0,5. 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 6,9 g/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 120 giờ 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 3,5 g/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 siêu lọc 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 bicacbonat 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 siêu lọc 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.

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 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20. Mẻ này được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 6

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 3 cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) 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 siêu lọc. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được làm khô lạnh một cách riêng rẽ và được hòa tan lại trong dimetylsulfoxit (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 siêu lọc 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 810 bar/6 cấy chuyển sau đó là 900 bar/3 cấy chuyển.

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

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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5 kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5 kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 2,5 mg 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 2,25 g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,35. 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 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.

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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 7

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 3 cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. Sau đó CRM197 đã tinh chế được liên hợp với polysacarit hoạt hóa bằng cách sử dụng niken clorua trong hỗn hợp phản ứng, và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp siêu lọc 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 380 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 siêu lọc 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. 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 bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 4,1 g/L và 150 mM. Nồng độ polysacarit được chọn lọc để kiểm soát kích thước của thể liên hợp thu được. Dung dịch sau đó 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 120 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 3,5 g/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 siêu lọc 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 bicacbonat 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa. Mẻ này được lọc ở 0,2 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. Mẻ này được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 8

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 4 cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 50°C, độ pH = 4,1 bằng chất đệm natri axetat để loại bỏ nhóm ketal một phần polysacarit. Dung dịch polysacarit được làm mát xuống 22°C trước khi hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. 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 bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5 kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 5,0 g 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 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 lọc màng ở nhiệt độ khoảng 4°C trong 3 ngày dựa trên natri clorua 150mM, 0,05% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, bằng cách sử dụng catxet thẩm tách NMWCO 300 kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron), được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 9

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 4 cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO+Aq) và PCV22 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 siêu lọc. CRM197 đã tinh chế sau đó được liên hợp với polysacarit hoạt hóa sử dụng niken clorua trong hỗn hợp phản ứng, và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp siêu lọc 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 300 bar/5 cấy chuyển để giảm kích cỡ đến 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 50°C và độ pH = 4,1 bằng chất đệm natri axetat để loại bỏ nhóm ketal một phần polysacarit. Sau đó dung dịch polysacarit được làm mát xuống 22°C trước khi hoạt hóa. Việc hoạt hóa polysacarit được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri metaperiodat 100mM. 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 bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 1,5 M độ pH 7,0. Độ PH đệm được chọn là để cải thiện độ ổn định của polysacarit được hoạt hóa trong 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 được kết hợp với dung dịch polysacarit đệm với tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 0,5. 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 8,3 g/L và 100 mM. Nồng độ polysacarit được chọn lọc để kiểm soát kích thước của thể liên hợp thu được. Sau đó dung dịch được lọc ở 0,2 micron. Niken clorua được bổ sung đến khoảng 2 mM bằng cách sử dụng dung dịch niken clorua 100 mM. Natri xyanoborohydrua (2 mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung. Việc liên hợp tiếp diễn trong 120 giờ để tối đa hóa tiêu thụ polysacarit và protein.

Khử bằng natri borohydrua

Sau phản ứng liên hợp, mẻ được pha loãng đến nồng độ polysacarit khoảng 3,5 g/L, làm lạnh đến 2-8°C, và được lọc ở 1,2 micron. Mẻ được lọc dựa trên kali phosphat 100 mM, độ pH 7,0 ở 2-8°C bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 100 kDa. Mẻ, được thu hồi trong phần thấm tích lại, sau đó được pha loãng đến khoảng 2,0 g polysacarit/L và được điều chỉnh độ pH bằng cách bổ sung natri bicacbonat 1,2 M,

độ pH 9,4. Natri borohydrua (1 mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung. Sau đó bổ sung thêm kali phosphat 1,5 M, độ pH 6,0.

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 ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa. Mẻ này sau đó được lọc ở 0,2 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. Mẻ này được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 10

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 5 cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 4°C và độ pH = 4,1 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. Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 4°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên natri axetat 10mM, độ pH = 4,1 bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa sau đó là lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 bổ sung thêm natri clorua đến nồng độ là 20 mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 2,0 g 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 ở nhiệt độ 22°C.

Pha loãng và trung hòa

Mẻ được pha loãng vào natri clorua 150 mM, 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 được thẩm tách ở nhiệt độ khoảng 4°C trong 3 ngày dựa trên natri clorua 150 mM, 0,05% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20, sử dụng catxet thẩm tách NMWCO 300 kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron) được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 11

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 5 cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. Sau đó CRM197 đã tinh chế được liên hợp với polysacarit hoạt hóa bằng cách sử dụng niken clorua trong hỗn hợp phản ứng, và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp siêu lọc 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 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 600 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 4°C và độ pH = 4,1 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. Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 4 giờ ở nhiệt độ 4°C.

Sản phẩm đã hoạt hóa được lọc màng dựa trên natri axetat 10mM, độ pH = 4,1 bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 1,5 M độ pH 6,0. Độ PH đệm được chọn là để cải thiện độ ổn định của polysacarit được hoạt hóa trong 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 kết

hợp với dung dịch polysacarit đệm với tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 là 0,4. 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 3.8 g/L và 150 mM. Nồng độ polysacarit được chọn lọc để kiểm soát kích cỡ của thể liên hợp thu được. Dung dịch sau đó được lọc ở 0,2 micron. Niken clorua được bổ sung đến khoảng 2 mM bằng cách sử dụng dung dịch niken clorua 100 mM. Natri xyanoborohydrua (2 mol trong mỗi mol đơn vị lặp polysacarit) được bổ sung. Việc liên hợp tiếp diễn trong 96 giờ để tối đa hóa tiêu thụ polysacarit và protein.

Tinh chế và trung hòa

Sau phản ứng liên hợp, mẻ được pha loãng đến nồng độ polysacarit khoảng 3,5 g/L, làm lạnh đến 2-8°C, và được lọc ở 1,2 micron. Mẻ được lọc dựa trên natri bicacbonat 300 mM độ pH 9,3 ở 2-8°C sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 100 kDa. Mẻ, được thu hồi trong phần thấm tích lại, sau đó được trung hòa bằng kali phosphat 1,5 M, độ pH 6,0.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

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

Mẻ được điều chỉnh đến nồng độ polysacarit là 1,0 g/L với L-histidin 10 mM bổ sung trong natri clorua 150 mM, chất đệm pH 7,0 với 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20. Mẻ được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở ≤ −60°C.

Ví dụ 12

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 6A cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO+Aq) và PCV22 bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Polysacarit được hòa tan, hoạt hóa về mặt hóa học và được trao đổi chất đệm bằng cách siêu lọc. Polysacarit hoạt hóa và CRM197 đã tinh chế được đông khô riêng lẻ và hòa tan lại trong DMSO. Dung dịch polysacarit hòa tan lại và CRM197 sau đó được kết hợp và liên hợp như mô tả bên dưới. Thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp siêu lọc 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6 mg 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 1,5 g 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 13

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 6B cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO/Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 1,85 g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,35. 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 14

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 6B cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10 kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 1,75 g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,35. 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 15

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 7F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 4°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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 2,6 g 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 16

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 7F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 4°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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 2,04 g 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 17

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 8 cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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/6 cấy chuyển. Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5 kDa.

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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5 kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 4,5 g 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 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.

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 siêu lọc 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 $\leq -60°C$.

Ví dụ 18

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 9V cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 230 bar/5,5 cấy chuyển. Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10 kDa.

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. Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 6 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10 kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 3,0 g 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 19

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 9V cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 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 siêu lọc. Sau đó CRM197 đã tinh chế được liên hợp với polysacarit hoạt hóa bằng cách sử dụng niken clorua trong hỗn hợp phản ứng, và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp siêu lọc 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 100 bar/5 cấy chuyển để giảm kích cỡ đến 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 siêu lọc 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. Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 6 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 0,7. 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 10,0 g/L và 100mM. Nồng độ polysacarit được chọn lọc để kiểm soát kích thước của thể liên hợp thu được. Dung dịch sau đó 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 120 giờ 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 3,5 g/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 siêu lọc 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 bicacbonat 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 siêu lọc 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.

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 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20. Mẻ này được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 20

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 9V cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. Sau đó CRM197 đã tinh chế được liên hợp với polysacarit hoạt hóa bằng cách sử dụng niken clorua trong hỗn hợp phản ứng, và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp siêu lọc 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 100 bar/5 cấy chuyển để giảm kích cỡ đến 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 siêu lọc 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. Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 6 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 10,0 g/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 120 giờ 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 3,5 g/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 siêu lọc 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 siêu lọc 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.

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 0,015% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20. Mẻ này được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 21

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 10A cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 615 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 3,5 g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,6. 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 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.

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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 22

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 10A cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 3,4 g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,6. 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 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.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ này sau đó được cô và được lọc màng dựa trên natri clorua 150mM, kali phosphat 25 mM, độ pH = 7,0 sau đó là 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 23

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 10A cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 3,8 g 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 $\leq -60°C$.

Ví dụ X

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 11A cho nghiên cứu đa hóa trị PCV24 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 800 bar/8 cấy chuyển. Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5 kDa.

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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5 kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 2,3 g 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 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.

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 siêu lọc 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 $\leq -60°C$.

Ví dụ 24

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 12F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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

axit axetic đến 200 mM, ủ ở nhiệt độ 80°C trong 155 phút, sau đó trung hòa bằng cách bổ sung chất đệm kali phosphat lạnh độ pH 7 đến 400 mM.

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

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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5 kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 2,7 g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,8. 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 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.

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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 25

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 12F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 60 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 1,5. 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 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kDa.

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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 26

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 14 cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) 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 siêu lọc. 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 thủy phân 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/6 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 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 thủy phân ở nhiệt độ khoảng 4°C trong 22,5 giờ dựa trên natri clorua 150mM, 0,05% polysorbat 20, bằng cách sử dụng catxet thẩm tách NMWCO 300 kDa.

Lọc lần cuối và bảo quản sản phẩm

Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron (với bộ lọc sơ bộ 0,5 micron), được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 27

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 14 cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. Sau đó CRM197 đã tinh chế được liên hợp với polysacarit hoạt hóa bằng cách sử dụng niken clorua trong hỗn hợp phản ứng, và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp siêu lọc 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/6 cấy chuyển để giảm kích cỡ đến 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 siêu lọc 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. 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 bằng cách sử dụng màng siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 1,0. 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 3,8 g/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 72 giờ 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 3,5 g/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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 100kDa. Mẻ, được thu hồi trong chất thẩm tích, sau đó được pha loãng đến khoảng 2,0g polysacarit/L và độ pH được điều chỉnh bằng cách bổ sung natri bicacbonat 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa. Sau đó mẻ này được lọc ở 0,2 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. Mẻ này được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 28

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 15A cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 210 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 sơ bộ đến 34°C. Dung dịch polysacarit được pha với natri clorua đến nồng độ bằng 25 mM. 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 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 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.

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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 29

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 15A cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 sơ bộ ở nhiệt độ 34°C. Dung dịch polysacarit được pha với natri clorua đến nồng độ bằng 25 mM. 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 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kDa.

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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 30

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 15C cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa.

Dung dịch polysacarit được gia nhiệt đến 60°C và chất đệm natri bicacbonat 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-axetyl. 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 31

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 15C cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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. Dung dịch polysacarit được gia nhiệt đến 60°C và chất đệm natri bicacbonat độ pH = 9,4 được bổ sung vào nồng độ cuối cùng 50mM. Mẻ này được ủ kèm trộn trong 12 giờ ở nhiệt độ 60°C để giải phóng các nhóm O-axetyl. Chất đệm kali phosphat độ pH = 6 được bổ sung vào nồng độ cuối cùng là 150 mM 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 3,2 g 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 $\leq -60°C$.

Ví dụ 32

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 18C cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 160 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10 kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 3,49 g 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 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 30 kDa.

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 siêu lọc 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 $\leq -60°C$.

Ví dụ 33

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 18C cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 160 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 2,49 g 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 34

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 19A cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 0,22 micron. Polysacarit được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 35

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 19A cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 0,22 micron. Polysacarit được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 3,8 g 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 36

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 19F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO), PCV23 (DMSO+Aq) và PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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/5 cấy chuyển.

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

Sau đó dung dịch polysacarit được điều chỉnh đến 4°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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 2,0 g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,2. 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 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 30kDa. Mẻ thẩm tích lại được lọc ở 0,2 micron sau đó được ủ ở nhiệt độ 22°C trong 4,5 ngày.

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 ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng màng siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 37

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 22F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO), PCV23 (DMSO+Aq) và PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 810 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 2,3 g 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 ở nhiệt độ 22°C.

Khử bằng natri borohydri

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.

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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 38

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 22F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. Sau đó CRM197 đã tinh chế được liên hợp với polysacarit hoạt hóa bằng cách sử dụng niken clorua trong hỗn hợp phản ứng, và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp siêu lọc 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 350 bar/5 cấy chuyển để giảm kích cỡ đến phân tử khối mục tiêu. Polysacarit đã giảm kích cỡ sau đó được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 7,5g/L và 100mM. Nồng độ polysacarit được chọn lọc để kiểm soát kích thước của thể liên hợp thu được. Dung dịch sau đó 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 120 giờ 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 3,5 g/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 siêu lọc 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 bicacbonat 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa.

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. Mẻ này được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 39

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 23B cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO), PCV23 (DMSO+Aq) và PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 40

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 23F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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. Phản ứng oxy hóa tiếp diễn trong 5 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 6 mg 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 2,1 g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,25. 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 41

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 23F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 2,1 g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 1,25. 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 42

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 24F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 80°C trong 150 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 2 mg 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 bằng 10 mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 1,4 g 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 43

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 24F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 80°C trong 150 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 5kDa và được lọc ở 0,2 micron.

Các polysacarit hoạt hóa được phối trộn để làm khô lạnh ở 2 mg 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 bằng 25 mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 1,4 g 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 44

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 33F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 510 bar/5 cấy chuyển.

Polysacarit đã giảm kích cỡ được cô và được lọc màng dựa trên nước bằng cách sử dụng màng siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 2,5 g 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 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.

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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 45

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 33F cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. Sau đó CRM197 đã tinh chế được liên hợp với polysacarit hoạt hóa bằng cách sử dụng niken clorua trong hỗn hợp phản ứng, và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng phương pháp siêu lọc 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 350 bar/4 cấy chuyển để giảm kích cỡ đến 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 độ ổn định 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 6,5 g/L và 100mM. Nồng độ polysacarit được chọn lọc để kiểm soát kích thước của thể liên hợp thu được. Dung dịch sau đó 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 96 giờ 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 3,5 g/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 siêu lọc 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 bicacbonat 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 300kDa. Mẻ này được lọc ở 0,2 micron và 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. Mẻ này được phân tán thành các phần phân ước và được cấp đông ở nhiệt độ ≤ −60°C.

Ví dụ 46

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 35B cho nghiên cứu đa hóa trị PCV23 (DMSO) và PCV23 (DMSO+Aq) 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 6,0 g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 3,0. 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 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ 47

Tạo ra thể liên hợp kiểu huyết thanh 35B cho nghiên cứu đa hóa trị PCV22 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 siêu lọc. 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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. 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 siêu lọc dòng tiếp tuyến NMWCO 10kDa. Bước siêu lọc 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 siêu lọc 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 20 mM. Polysacarit và dung dịch CRM197 được trộn để đạt được nồng độ polysacarit bằng 6,0 g Ps/L và tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 bằng 3,0. 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 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 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 siêu lọc 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 siêu lọc 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 ≤ −60°C.

Ví dụ Y

Tạo ra các kiểu huyết thanh cho nghiên cứu đa hóa trị PCV24 bằng cách sử dụng liên hợp DMSO

Các thể liên hợp được tạo ra cho nghiên cứu PCV24 bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự như các phương pháp được mô tả trong các ví dụ trước. Đối với mỗi kiểu huyết thanh, polysacarit được hòa tan, được hoạt hóa hóa học và được trao đổi chất đệm bằng phương pháp siêu lọc. 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 siêu lọc 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. Sự khác biệt so với các ví dụ trước có thể bao gồm: áp suất đồng nhất hóa và số lần cấy chuyển, thời gian oxy hóa, nồng độ polysacarit và sucroza để làm khô lạnh, nồng độ polysacarit trong quá trình liên hợp, tỷ lệ khối lượng polysacarit với CRM197 và nồng độ muối trong phản ứng liên hợp

Ví dụ 48

Phối trộn vacxin liên hợp phế cầu khuẩn

Các thể liên hợp polysacarit-protein phế 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 vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 8, 15, 22, 23 và 24.

Sản phẩm thuốc vacxin PCV8/APA được tạo ra bằng cách liên hợp riêng rẽ protein CRM197 với các kiểu polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) (8, 10A, 12F, 15A, 15C, 23B, 24F và 35B) sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (còn được gọi là hóa học DMSO) và được phối trộn trong L-histidin 20mM độ pH = 5,8, NaCl 150mM và polysorbat 20 (PS-20) 0,1% (trọng lượng/thể tích) và 250 µg [Al]/mL dưới dạng chất phụ trợ nhôm phosphat làm chất phụ trợ ở 4 µg/mL mỗi kiểu huyết thanh cho tổng nồng độ polysacarit là 32 µg/mL.

Sản phẩm thuốc vacxin PCV15/APA được tạo ra bằng cách liên hợp riêng rẽ protein CRM197 với các kiểu polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) (6A, 6B, 7F, 9V, 18C, 19A, 19F, 23F) sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (còn được gọi là hóa học DMSO) hoặc cho các kiểu 1, 3, 4, 5, 14, 22F và 33F sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi protic (còn được gọi là hóa học chứa nước) và được phối trộn

trong L-Histidin 20 mM độ pH 5,8 và NaCl 150 mM polysorbat 20 (PS-20) 0,2% trọng lượng/thể tích và 250 µg [Al]/mL dưới dạng nhôm phosphat làm chất phụ trợ ở 4 µg/mL mỗi kiểu huyết thanh (ngoại trừ 6B ở 8 µg/mL) cho tổng nồng độ polysacarit là 64 µg/mL.

Sản phẩm thuốc vacxin PCV22 được sử dụng để tạo miễn dịch cho chuột và thỏ được điều chế bằng cách liên hợp riêng rẽ protein CRM197 với các kiểu polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, và 35B) sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung dịch protic và aprotic (DMSO/chứa nước "Aq") và được phối trộn trong L-Histidin 20 mM độ pH 5,8 và NaCl 150 mM và polysorbat 20 (PS-20) 0,2% trọng lượng/thể tích ở 0,8 µg/mL mỗi kiểu huyết thanh (ngoại trừ 6B ở 1,6 µg/mL) cho tổng nồng độ polysacarit là 18,4 µg/mL được gọi là PCV22 không được phụ trợ hoặc không phụ trợ. Theo phương án cụ thể khác, dạng phối trộn này được tạo ra với 50 µg [Al]/mL dưới dạng nhôm phosphat làm chất phụ trợ được gọi là PCV22/APA.

Sản phẩm thuốc vacxin PCV23 được tạo ra bằng cách liên hợp riêng rẽ protein CRM197 với các kiểu polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, và 35B) bằng cách sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (cũng được gọi là hóa học DMSO) và được phối trộn trong L-Histidin 20 mM độ pH 5,8 và NaCl 150 mM và polysorbat 20 (PS-20) 0,2% trọng lượng/thể tích ở 4 µg/mL mỗi loại cho tổng nồng độ polysacarit là 92 µg/mL được gọi là PCV23 không được phụ trợ. Theo phương án cụ thể khác, dạng phối trộn này được tạo ra với 250 µg [Al]/mL ở dạng chất phụ trợ nhôm phosphat làm chất phụ trợ được gọi là PCV23/APA. Theo phương án khác, sản phẩm thuốc vacxin PCV23 được tạo ra bằng cách liên hợp riêng rẽ protein CRM197 với các kiểu polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) (1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F và 33F) sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi protic (còn được gọi là hóa học chứa nước) và liên hợp protein CRM197 với các kiểu polysacarit phế cầu khuẩn (PnPs) (6A, 6B, 7F, 8, 10A, 12F, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23B, 23F, 24F, và 35B) sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (còn được gọi là hóa học DMSO). Sản phẩm thuốc vacxin được phối trộn trong L-Histidin 20 mM độ pH 5,8 và NaCl 150 mM và polysorbat 20 (PS-20) 0,1% trọng lượng/thể tích với carboxymetyl xenluloza (CMC) 0,01% ở 4 µg/mL mỗi kiểu huyết thanh (ngoại trừ 6B ở 8 µg/mL) tính theo tổng nồng độ polysacarit là 96

µg/mL và được tạo ra với 250 µg [Al]/mL dưới dạng chất phụ trợ nhôm phosphat làm chất phụ trợ và được gọi là PCV23 (DMSO + Aq)/APA.

Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị PCV24 được tạo ra bằng cách liên hợp riêng rẽ protein CRM197 với các kiểu huyết thanh polysacarit *S. pneumoniae* (PnPs) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B sử dụng phản ứng amin hóa khử trong dung môi aprotic (còn được gọi là hóa học DMSO) và được phối trộn trong L-Histidin 20 mM độ pH 5,8, NaCl 150 mM và polysorbat 20 (PS-20) 0,1% trọng lượng/thể tích ở 4 µg/mL hoặc 8 µg/mL của mỗi kiểu huyết thanh polysacarit cho tổng nồng độ polysacarit lần lượt là 96 µg/mL hoặc 192 µg/mL, và được gọi là "PCV24 không được phụ trợ". Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị PCV24 được tạo ra trong L-Histidin 20 mM độ pH 5,8, NaCl 150 mM và polysorbat 20 (PS-20) 0,2% trọng lượng/thể tích ở 4 µg/mL của mỗi kiểu huyết thanh polysacarit cho tổng nồng độ polysacarit là 96 µg/mL còn chứa 250 µg [Al]/mL ở dạng chất phụ trợ nhôm phosphat. Nó được gọi là "PCV24/APA".

Thể tích yêu cầu của các thể liên hợp dạng khối cần thiết để thu được nồng độ mục tiêu của các kiểu huyết thanh riêng rẽ được tính toán dựa trên thể tích mẻ và nồng độ của các nồng độ polysacarit dạng khối riêng rẽ. Các thể liên hợp riêng rẽ được bổ sung dung dịch histidin, natri clorua và polysorbat 20 (PS-20) để sản xuất hỗn hợp liên hợp 2X-4X. Bình phối trộn chứa hỗn hợp liên hợp được trộn bằng thanh khuấy từ, được lọc vô trùng vào bình khác. Hỗn hợp 2x-4x đã lọc vô trùng được bổ sung vào bình khác chứa chất phụ trợ nhôm phosphat hoặc được pha loãng với nước muối để đạt được tổng nồng độ polysacarit, tá dược và chất phụ trợ APA mục tiêu mong muốn (nếu cần). Sau đó, các dạng phối trộn được đóng vào lọ thủy tinh hoặc ống tiêm và được bảo quản ở 2-8°C.

Ví dụ 49

Khả năng sinh miễn dịch PCV22 và kháng thể chức năng ở chuột nhắt

Chuột nhắt cái chưa lớn Balb/c (6-8 tuần tuổi, n=10/nhóm) được tạo miễn dịch bằng 0,1 mL vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 22 (PCV22/APA hoặc PCV22 không được phụ trợ) vào ngày 0, ngày 14, và ngày 28. PCV22 được định liều ở 0,08 µg mỗi polysacarit phế cầu khuẩn (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 24F, 33F, 35B) và 6B ở 0,16 µg và tất cả được liên hợp với CRM197

không được phụ trợ hoặc với 5 µg chất phụ trợ nhôm phosphat (APA) 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 vacxin ở chuột nhắt 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. 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. 10^5 cfu 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 nhắt được phê duyệt bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật ở Merck & Co., Inc.

Huyết thanh chuột nhắt 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 nhắt dựa trên thử nghiệm ở người được mô tả trong Marchese et al.[3] 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 nhắt được đánh dấu SULFO-TAG™ được sử dụng làm kháng thể thứ cấp để thử nghiệm các mẫu huyết thanh chuột nhắt. 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 [1, 2].

Huyết thanh của chuột được gộp chung cho từng nhóm và được thử nghiệm trong các xét nghiệm điện hóa phát quang kết hợp để xác định độ chuẩn kháng thể. PCV22 đã tạo ra độ chuẩn kháng thể ở chuột cho tất cả các kiểu huyết thanh sau khi tạo miễn dịch

1, 2 và 3 với vacxin (FIG.1). PCV22 thể hiện phản ứng chéo với kiểu huyết thanh 15B, bằng chứng là độ chuẩn IgG (FIG.1). PCV22 được bào chế với APA có xu hướng hướng tới khả năng sinh miễn dịch cao hơn so với PCV22 không được phụ trợ ở chuột ở PD2 (dữ liệu không được thể hiện) và PD3 (FIG.2).

Huyết thanh của chuột được gộp chung cho từng nhóm và được thử nghiệm trong thử nghiệm thực bào bởi opsonin đa hợp (MOPA) để xác định độ chuẩn kháng thể chức năng. PCV22 đã tạo ra độ chuẩn kháng thể chức năng ở chuột, tiêu diệt các kiểu huyết thanh vi khuẩn loại vacxin sau 3 lần tạo miễn dịch bằng vacxin (FIG.3). PCV22 được phối trộn với APA có xu hướng hướng tới độ chuẩn kháng thể chức năng cao hơn so với PCV22 không được phụ trợ ở PD2 (dữ liệu không được thể hiện) và PD3 (FIG.4), tương tự như độ chuẩn IgG (FIG.2).

Chuột nhắt được tạo miễn dịch bằng PCV22 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 cả hai nhóm PCV22 không được phụ trợ (PCV22 không phụ trợ) và PCV22/APA được bảo vệ một cách đáng kể khỏi thách thức khi so với nhóm còn non ($P<0,0001$). Tương tự, các nhóm chuột nhắt được tạo miễn dịch bằng PCV22 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 50

Tính sinh miễn dịch PCV22 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 vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 22 (PCV22/APA hoặc PCV22 không được phụ trợ) vào ngày 0 và ngày 14 (đối bên). PCV22 được định liều ở 0,08 µg PnPs trong mỗi polysacarit phế cầu khuẩn (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B) và 6B ở 0,16 µg và tất cả được liên hợp với CRM197 và không được phụ trợ hoặc phối trộn với 5 µg APA với mỗi lần tạo miễn dịch. 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 thỏ 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.[3] 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 ở www.vaccine.uab.edu và phần mềm Opsotiter® 3 được sở hữu và cấp phép bởi đại học Alabama (UAB) Research Foundation[1,2].

Huyết thanh thỏ được thử nghiệm riêng rẽ trong các thử nghiệm điện hóa phát quang ghép lại để xác định độ chuẩn kháng thể. PCV22 đã tạo ra độ chuẩn kháng thể ở thỏ cho tất cả các kiểu huyết thanh sau khi tạo miễn dịch bằng vacxin (FIG.6). Tạo miễn dịch cho thỏ bằng PCV22 cũng tạo ra kháng thể liên kết với polysacarit kiểu huyết thanh 15B (FIG.6). Không có lợi ích khi bao gồm APA với PCV22 ở thỏ, vì tính sinh miễn dịch tương đương hoặc thấp hơn (kiểu huyết thanh 1) PCV22 không được phụ trợ ở PD2 (FIG.7).

Huyết thanh thỏ được thử nghiệm riêng rẽ trong thử nghiệm thực bào bởi opsonin đa hợp (MOPA) để xác định độ chuẩn kháng thể chức năng. PCV22 tạo ra độ chuẩn kháng thể chức năng ở thỏ tiêu diệt các kiểu huyết thanh vi khuẩn loại vacxin sau 2 lần tạo miễn dịch với vacxin (FIG.8). PCV22 không được phụ trợ có độ chuẩn kháng thể chức năng cao hơn ở PD1 đối với kiểu huyết thanh 4 (dữ liệu không được thể hiện) và ở PD2 đối với kiểu huyết thanh 1, 3 và 4 so với PCV22 được phối trộn với APA. PCV22 được phối trộn với APA không có độ chuẩn kháng thể chức năng cao hơn ở PD1 (dữ liệu không được thể hiện) và PD2 đối với hầu hết các kiểu huyết thanh so với PCV22 không được phụ trợ (FIG.8).

Ví dụ 51

Tính sinh miễn dịch PCV21 ở khỉ rezut mới sinh

Khỉ rezut mới sinh (IRM, 2-3 tháng tuổi, n = 8-9/nhóm) được tiêm trong cơ 0,1mL vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 23 (PCV23) vào các ngày 0, 28 và 56. PCV23 được định liều 9,6 µg tổng polysacarit phế cầu khuẩn (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B tại 0,4 µg, 6B ở 0,8 µg và tất cả đều được liên hợp với CRM197) không được phụ trợ hoặc được phối trộn với 25 µg chất phụ trợ nhôm phosphat (APA) cho mỗi lần tạo miễn dịch. Nhóm IRM bổ sung được tiêm trong cơ với 0,1mL PCV15. PCV15 được định liều ở 6,4 µg tổng polysacarit phế cầu khuẩn (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F ở 0,4 µg, 6B ở 0,8 µg và tất cả được liên hợp với CRM197 với 25 µg APA với mỗi lần chủng ngừa) trong một phần tư và 0,1 mL PCV8 (8, 10A, 12F, 15A, 15C, 23B, 24F và 35B ở 0,4 µg và tất cả được liên hợp với CRM197 với 25 µg APA cho mỗi lần tạo miễn dịch) trong một phần tư riêng biệt theo cùng lịch trình như đã mô tả ở trên. Huyết thanh được gom trước khi nghiên cứu bắt đầu (tiền miễn dịch, ngày 0) và vào ngày 14 (PD1), 28, 42 (PD2), 56, và 70 (PD3). Các IRM được đội ngũ chăm sóc động vật đã được đào tạo quan sát ít nhất hàng ngày nếu có bất kỳ dấu hiệu ốm yếu hoặc kiệt sức nào. Tất cả các thí nghiệm trên động vật được thực hiện theo đúng các khuyến nghị 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 nhắt được phê duyệt bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật ở Merck & Co., Inc và New Iberia Research Center.

Huyết thanh khỉ 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 khỉ rezut dựa trên thử nghiệm ở người được mô tả trong Marchese et al. and Skinner et al[3, 4] 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 khỉ rezut.

Tạo miễn dịch IRM với độ chuẩn kháng thể tạo ra PCV23 cho tất cả các kiểu huyết thanh cho tất cả các dạng phối trộn vacxin PCV23 được đánh giá (FIG.9A-

FIG.9D). Cũng cần lưu ý rằng PCV23, chứa thể liên hợp polysacarit 15A-CRM197 và 15C-CRM197, cũng cung cấp phản ứng chéo với 15B, như được chứng minh trong ECL (FIG.9A-FIG.9D). PCV23 được tạo miễn dịch với một liều vacxin trong IRM (FIG.9A-FIG.9D).

Dạng phối trộn PCV23 (DMSO)/APA có khả năng sinh miễn dịch cao hơn đối với kiểu huyết thanh 22F so với PCV23 không được phụ trợ ở PD1 trong khi PCV23 (DMSO + Aq)/APA có khả năng sinh miễn dịch cao hơn đối với kiểu huyết thanh 1 và kiểu huyết thanh 15C so với PCV23 không được phụ trợ ở PD1 (FIG.10A). Dạng phối trộn PCV23 (DMSO)/APA có khả năng sinh miễn dịch cao hơn đối với kiểu huyết thanh 18C so với PCV23 không được phụ trợ ở PD2 (FIG.10B). PCV23 (DMSO + Aq)/APA có khả năng sinh miễn dịch cao hơn đối với phần lớn các kiểu huyết thanh (1, 3, 4, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19F, 22F và 23F) so với PCV23 không được phụ trợ ở PD2 (FIG.10B). PCV23 (DMSO + Aq)/APA có tính sinh miễn dịch cao hơn đối với các kiểu huyết thanh 1, 4 và 9V so với PCV23 không được phụ trợ ở PD3 (FIG.10C).

IRM được tiêm vacxin PCV23 (DMSO + Aq)/APA hoặc sử dụng đồng thời PCV15/APA + PCV8/APA ở các chi riêng biệt không cho thấy nhiều sự khác biệt về tính sinh miễn dịch ở PD1, ngoại trừ kiểu huyết thanh 10A có tính sinh miễn dịch cao hơn ở nhóm sử dụng đồng thời (FIG.11A). Tuy nhiên, IRM được tiêm vacxin PCV23 (DMSO + Aq)/APA có tính sinh miễn dịch PD2 cao hơn đối với phần lớn các kiểu huyết thanh 1, 3, 4, 5, 7F, 8, 9V, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19F, 22F, 23B và 23F so với sử dụng đồng thời PCV15/APA + PCV8/APA (FIG.11B). Không có sự khác biệt về tính sinh miễn dịch giữa hai loại vacxin ở PD3 (FIG.11C).

Khi đánh giá tác dụng tăng cường kháng thể, tất cả các PCV đều tạo ra các đáp ứng miễn dịch chính ở PD1 so với huyết thanh tiền miễn dịch đối với tất cả các kiểu huyết thanh, ngoại trừ kiểu huyết thanh 23B trong IRM được tạo miễn dịch với PCV23 (DMSO + Aq)/APA (FIG.12A). Tất cả các PCV được đánh giá đều tạo ra độ chuẩn kháng thể cao hơn đáng kể ở PD2 và PD3 khi so sánh với huyết thanh tiền miễn dịch đối với tất cả các kiểu huyết thanh (FIG.12B và FIG.12C). Liều PCV thứ hai làm tăng độ chuẩn kháng thể từ PD2 so với PD1 đối với tất cả các kiểu huyết thanh ngoại trừ kiểu huyết thanh 3 và kiểu huyết thanh 1 trong IRM được tạo miễn dịch với PCV23 không được phụ trợ, PCV23 (DMSO)/APA và PCV15/APA + PCV8/APA (FIG.12D). Liều PCV thứ ba làm tăng độ chuẩn kháng thể cho phần lớn các kiểu huyết thanh, ngoại trừ

IRM được tạo miễn dịch với PCV23 (DMSO+Aq)/APA, nơi có sự giảm ở PD3 so với PD2, cho thấy rằng IRM được tạo miễn dịch PCV23 (DMSO+Aq)/APA đạt được đáp ứng kháng thể tối đa ở PD2 (FIG.12E).

Ví dụ Z

Tính sinh miễn dịch của PCV24 ở thỏ trắng New Zealand và khỉ rezut mới sinh

Thỏ trắng New Zealand (NZWR, n = 8/nhóm) được tiêm trong cơ với 0,1mL vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 24 (PCV24) vào các ngày 0 và 14. PCV24 được định liều ở 9,6 µg của tổng polysacarit phế cầu khuẩn (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, deOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B ở 0,4 µg và tất cả đều được liên hợp theo CRM197) và được phối trộn với chất phụ trợ nhôm phosphat (APA, 25 µg) cho 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) 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.

Khỉ rezut mới sinh (IRM, 2-3 tháng tuổi, n = 5/nhóm) được tiêm trong cơ với 0,1mL vacxin liên hợp phế cầu khuẩn hóa trị 24 (PCV24) vào các ngày 0, 28 và 56. PCV24 được định liều ở 9,6 µg của tổng polysacarit phế cầu khuẩn (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, deOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B ở 0,4 µg và tất cả đều được liên hợp với CRM197) và được phối trộn với chất phụ trợ nhôm phosphat (APA, 25 µg) cho 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 và 70 (PD3). IRM 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. 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 được phê duyệt bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật ở cả Merck & Co., Inc và New Iberia Research Center.

Huyết thanh khỉ 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 khỉ rezut dựa trên thử nghiệm ở người được mô tả trong Marchese et al. and Skinner et al [3, 4] 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 khỉ rezut và kháng IgG thỏ được đánh dấu SULFO-TAG™ cho các mẫu thỏ trắng New Zealand.

Kháng thể chức năng được xác định thông qua thử nghiệm thực bào bởi opsonin (MOPA) dựa trên các phương pháp được mô tả từ trước tại www.vaccine.uab.edu và phần mềm Opsotiter® 3 thuộc sở hữu và được cấp phép từ Quỹ nghiên cứu đại học Alabama (UAB) [1, 2].

Việc tạo miễn dịch NZWR với PCV24 tạo ra độ chuẩn kháng thể đối với tất cả các kiểu huyết thanh trong vacxin (FIG.13A). Cũng cần lưu ý rằng PCV24, chứa các thể liên hợp polysacarit 15A-CRM197, deOAc15B-CRM197, 6A-CRM197, 6B-CRM197 cũng cung cấp tính phản ứng chéo với 15B và 6C, như được chứng minh trong ECL (FIG.13A).

Huyết thanh NZWR được thử nghiệm riêng rẽ trong thử nghiệm thực bào bởi opsonin (MOPA) để xác định độ chuẩn kháng thể chức năng. PCV24 tạo ra độ chuẩn kháng thể chức năng trong NZWR tiêu diệt tất cả các kiểu huyết thanh vi khuẩn kiểu vacxin (FIG.13B).

Việc tạo miễn dịch IRM với PCV24 tạo ra độ chuẩn kháng thể đối với tất cả các kiểu huyết thanh trong vacxin (FIG.14A). Cũng cần lưu ý rằng PCV24, chứa các thể liên hợp polysacarit 15A-CRM197, deOAc15B-CRM197, 6A-CRM197, 6B-CRM197 cũng cung cấp tính phản ứng chéo với 15B và 6C, như được chứng minh trong ECL (FIG.14A).

Huyết thanh IRM được thử nghiệm riêng rẽ trong thử nghiệm thực bào bởi opsonin (MOPA) để xác định độ chuẩn kháng thể chức năng. PCV24 tạo ra độ chuẩn kháng thể chức năng trong IRM tiêu diệt các kiểu huyết thanh vi khuẩn kiểu vắc xin (FIG.14B), ngoại trừ 33F, cũng có độ chuẩn kháng thể PD3/liên kết trước thấp hơn trong ECL. Tuy nhiên, khi PCV24/APA được đánh giá ở thỏ trắng New Zealand, độ chuẩn PD2 33F OPA cao hơn 58 lần so với độ chuẩn tiền miễn dịch (FIG.13B).

Tài liệu tham khảo

1. Caro-Aguilar I, Indrawati L, Kaufhold RM, Gaunt C, Zhang Y, Nawrocki DK, et al. Immunogenicity differences of a 15-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (PCV15) based on vaccine dose, route of immunization and mouse strain. Vaccine 2017 Feb 07;35(6):865-72.

2. Burton RL, Nahm MH. Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (MOPA4) for pneumococcal antibodies. Clin Vaccine Immunol 2006 Sep;13(9):1004-9.

3. Marchese RD, Puchalski D, Miller P, Antonello J, Hammond O, Green T, Rubinstein LJ, Caulfield MJ, Sikkema D. Optimization and validation of a multiplex, electrochemiluminescence-based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype-specific antipneumococcal antibodies in human serum. Clin Vaccine Immunol. 2009 Mar;16(3):387-96.

4. Skinner, J.M., et al., Pre-clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. Vaccine, 2011. **29**(48): p. 8870-8876.

Ví dụ 52

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 chập 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 Mn, phân tử lượng trung bình trọng số Mw, và phân tử lượng trung bình z Mz (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 polysacarit 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-hydroxysucxinimidyl 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.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 24 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 kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* là 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B được khử O-axetyl, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F 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.

2. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa chất phụ trợ.

3. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 2, trong đó chất phụ trợ là chất phụ trợ nhôm phosphat.

4. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa 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 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B được khử O-axetyl, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B, và protein mang là CRM197.

5. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 4, trong đó chế phẩm này chứa chất phụ trợ.

6. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 5, trong đó chất phụ trợ là chất phụ trợ nhôm phosphat.

7. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa thể liên hợp polysacarit protein mang *S. pneumoniae*, trong đó mỗi một trong các thể liên hợp chứa polysacarit của kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* cụ thể được liên hợp với protein mang, trong đó kiểu huyết thanh *S. pneumoniae* về cơ bản gồm 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B được khử O-axetyl, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F và 35B, và protein mang là CRM197.

8. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 7, trong đó chế phẩm này chứa chất phụ trợ.

9. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 8, trong đó chất phụ trợ là chất phụ trợ nhôm phosphat.

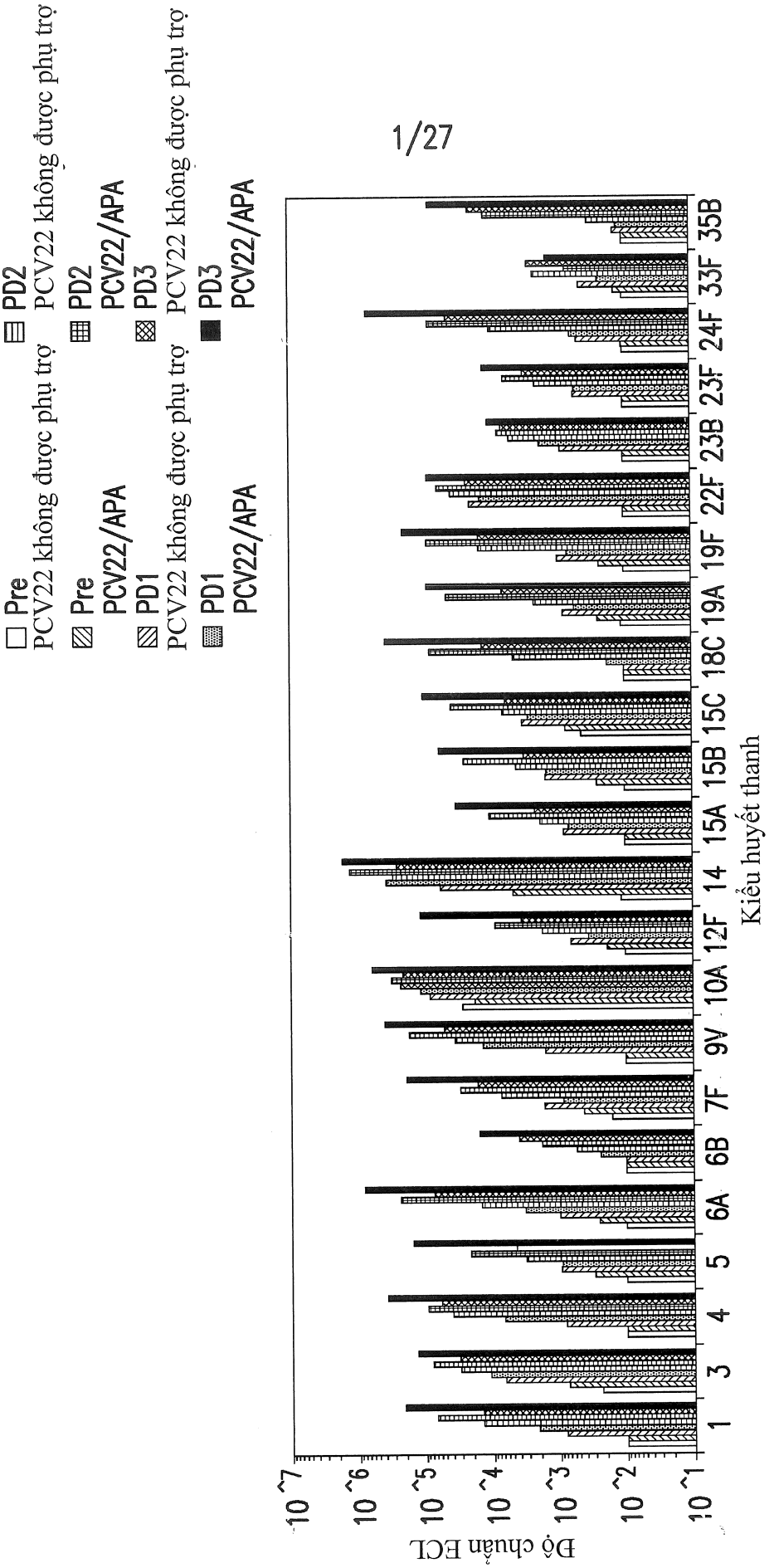
Pre
PCV22 không được phụ trợ
PD2
PCV22 không được phụ trợ
Pre
PCV22/APA
PD2
PCV22/APA
PD1
PCV22 không được phụ trợ
PD3
PCV22 không được phụ trợ
PD1
PCV22/APA
PD3
PCV22/APA
1/27
Độ chuẩn ECL
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
1
3
4
5
6A
6B
7F
9V
10A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG. 1

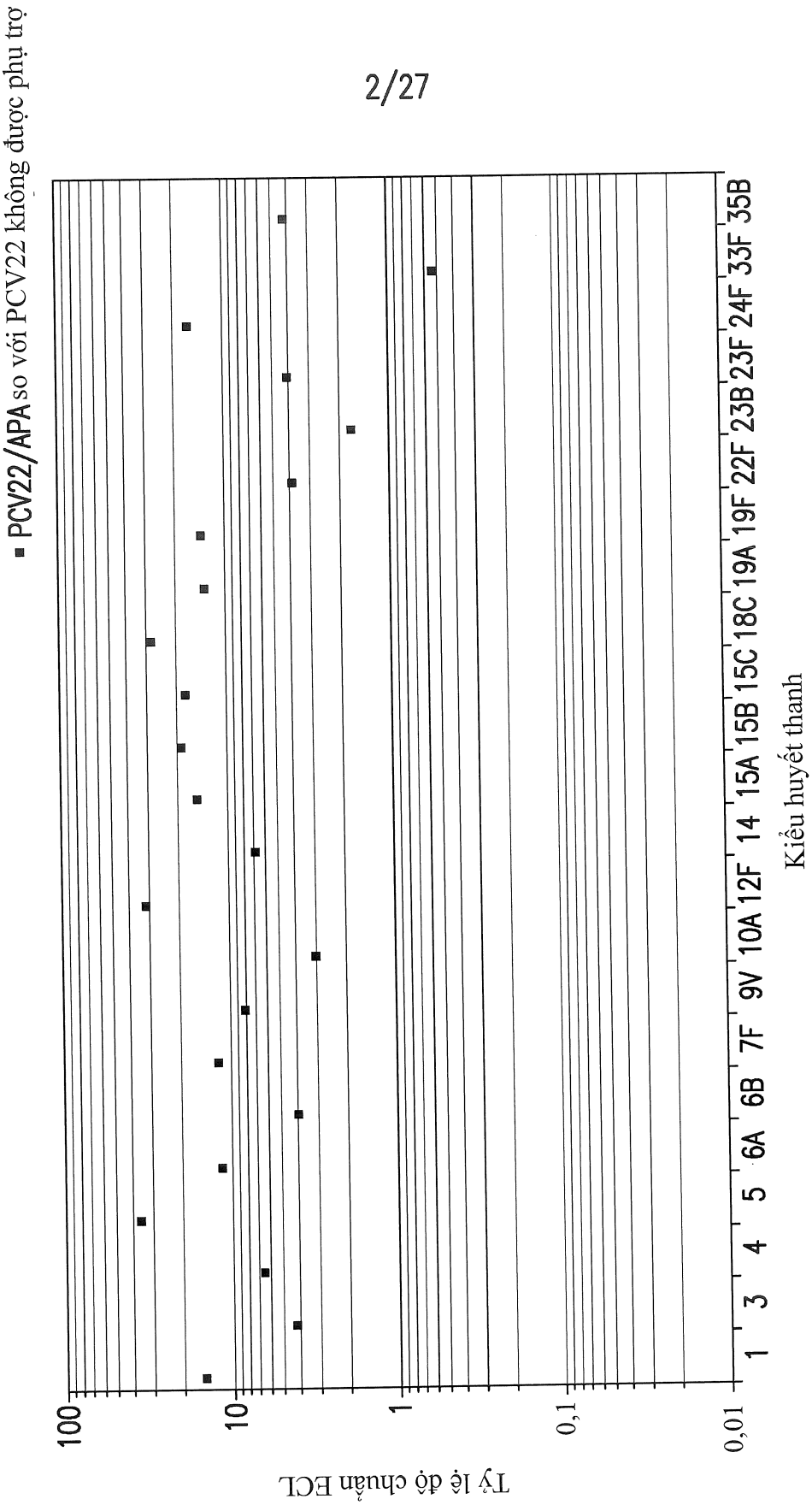
■ PCV22/APA so với PCV22 không được phụ trợ
Tỷ lệ độ chuẩn ECL
100
10
1
0,1
0,01
1
3
4
5
6A
6B
7F
9V
10A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.2

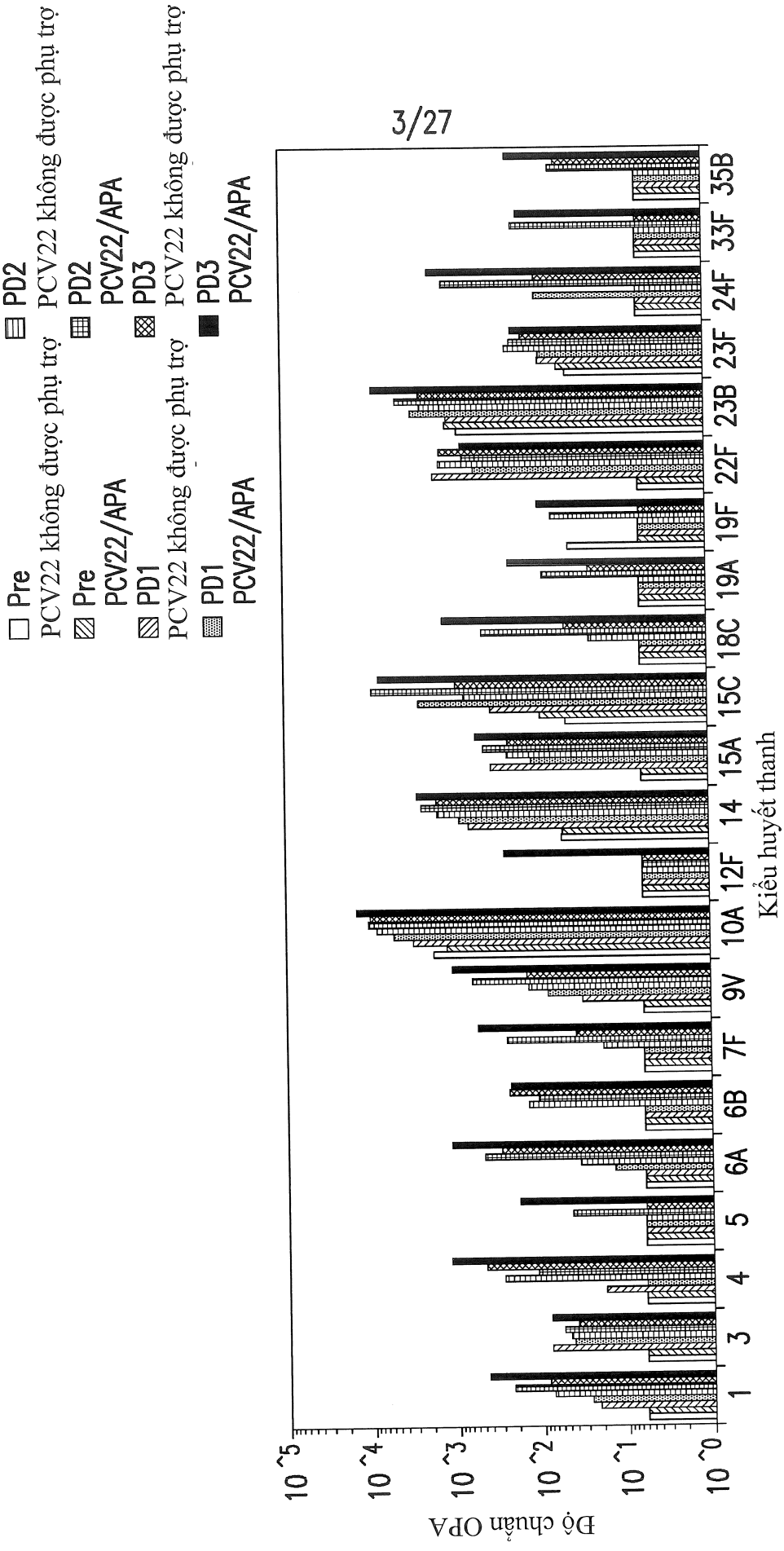
Pre
PCV22 không được phụ trợ
Pre
PCV22/APA
PD1
PCV22 không được phụ trợ
PD1
PCV22/APA
PD2
PCV22 không được phụ trợ
PD2
PCV22/APA
PD3
PCV22 không được phụ trợ
PD3
PCV22/APA
3/27
Độ chuẩn OPA
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
1
3
4
5
6A
6B
7F
9V
10A
12F
14
15A
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.3

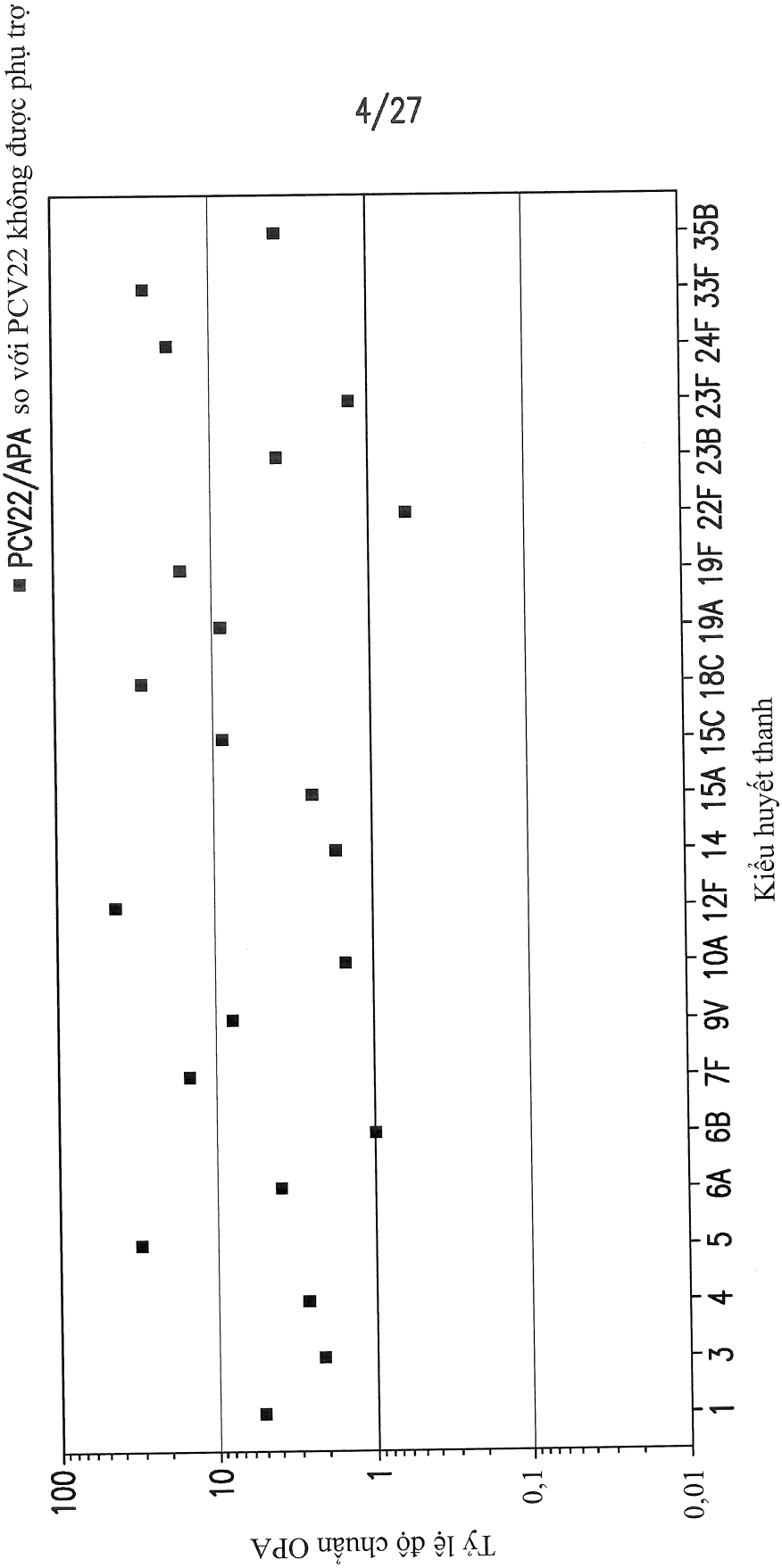
■ PCV22/APA so với PCV22 không được phụ trợ
Tỷ lệ độ chuẩn OPA
100
10
1
0,1
0,01
1 3 4 5 6A 6B 7F 9V 10A 12F 14 15A 15C 18C 19A 19F 22F 23B 23F 24F 33F 35B
Kiểu huyết thanh

FIG.4

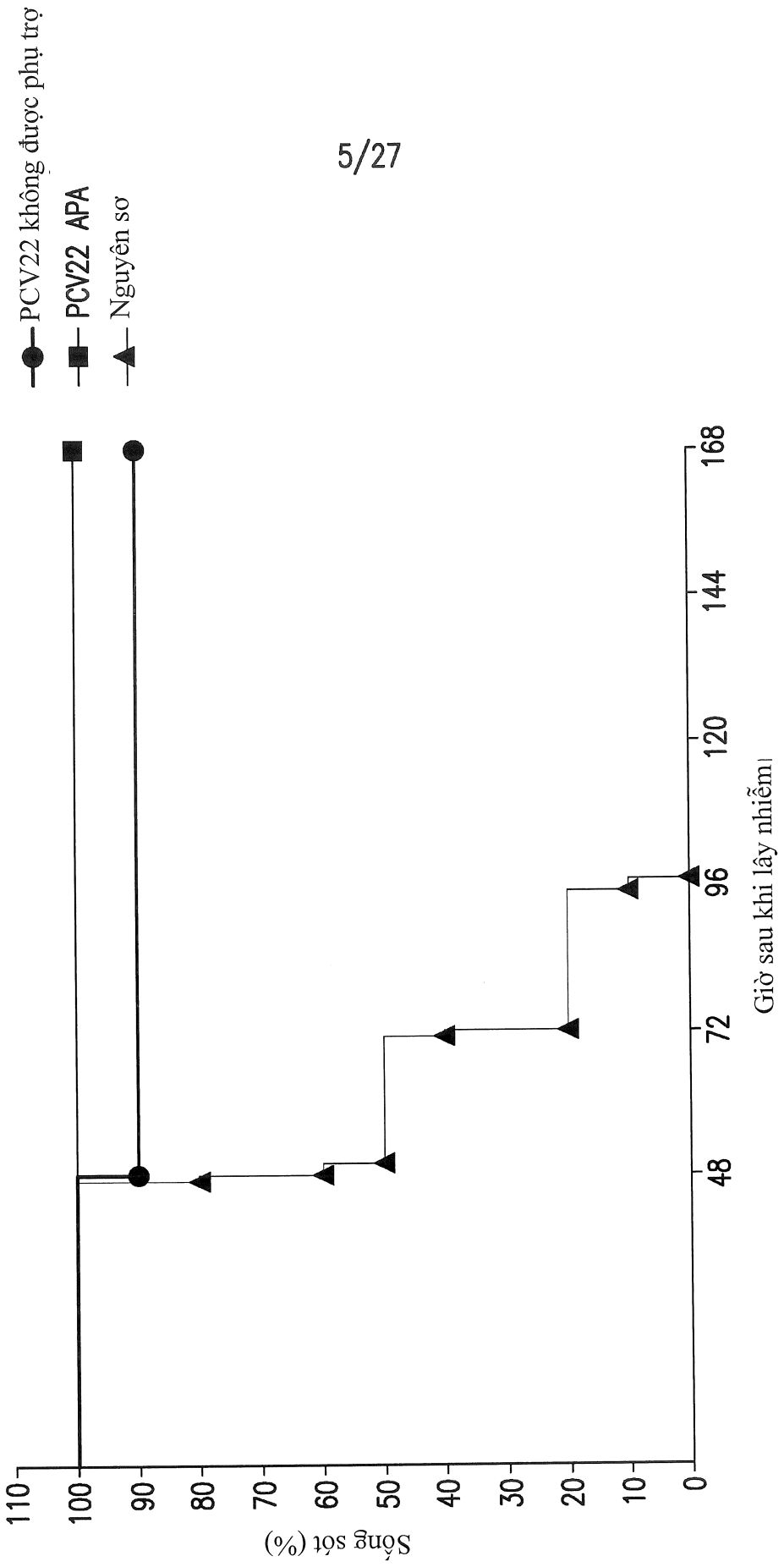
PCV22 không được phụ trợ
PCV22 APA
Nguyên sơ
Sống sót (%)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
48
72
96
120
144
168
Giờ sau khi lây nhiễm

FIG.5

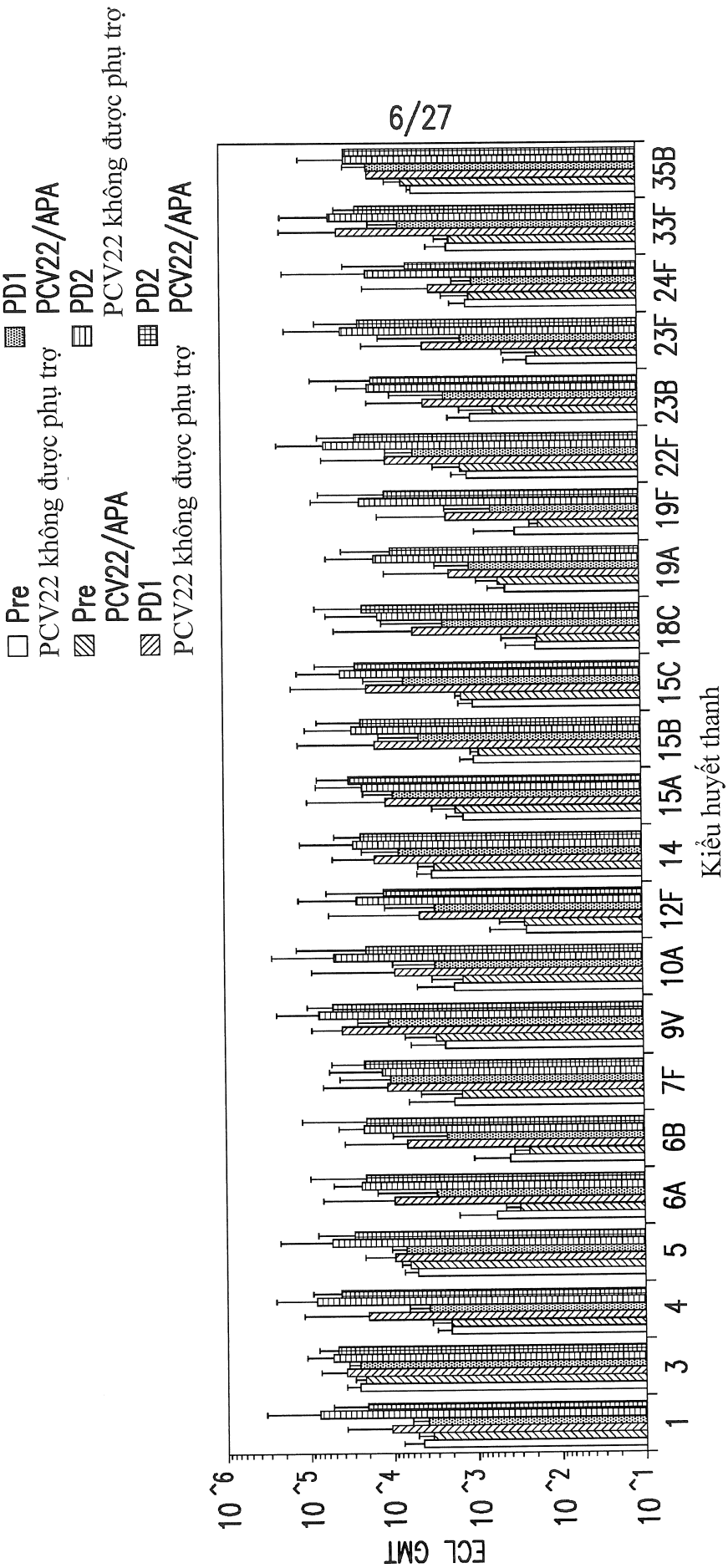
Pre
PCV22 không được phụ trợ
PD1
PCV22/APA
Pre
PCV22/APA
PD2
PCV22 không được phụ trợ
PD1
PCV22 không được phụ trợ
PD2
PCV22/APA
6/27
ECL GMT
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
1
3
4
5
6A
6B
7F
9V
10A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.6

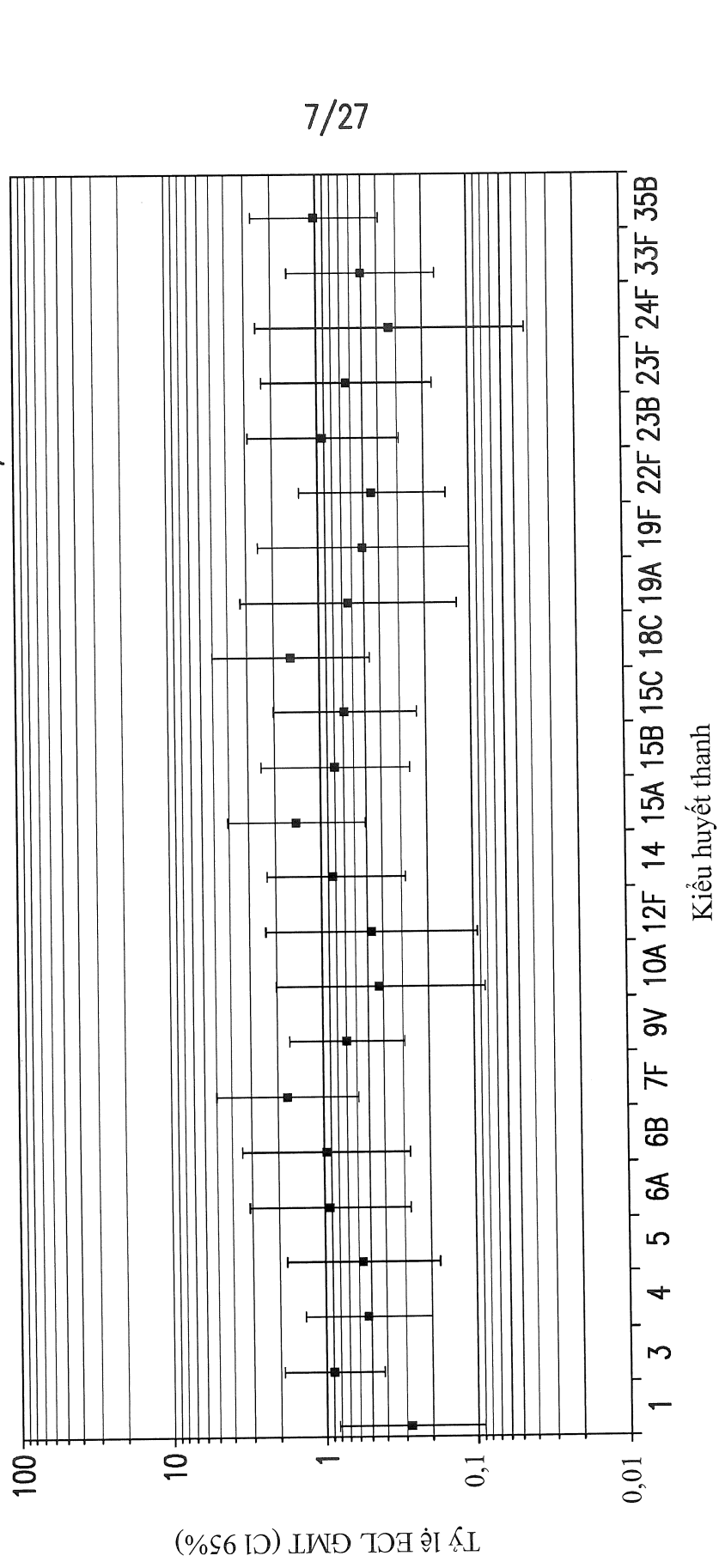
■ PCV22/APA so với PCV22 không được phụ trợ
Tỷ lệ ECL GMT (CI 95%)
100
10
1
0,1
0,01
1 3 4 5 6A 6B 7F 9V 10A 12F 14 15A 15B 15C 18C 19A 19F 22F 23B 23F 24F 33F 35B
Kiểu huyết thanh

FIG. 7

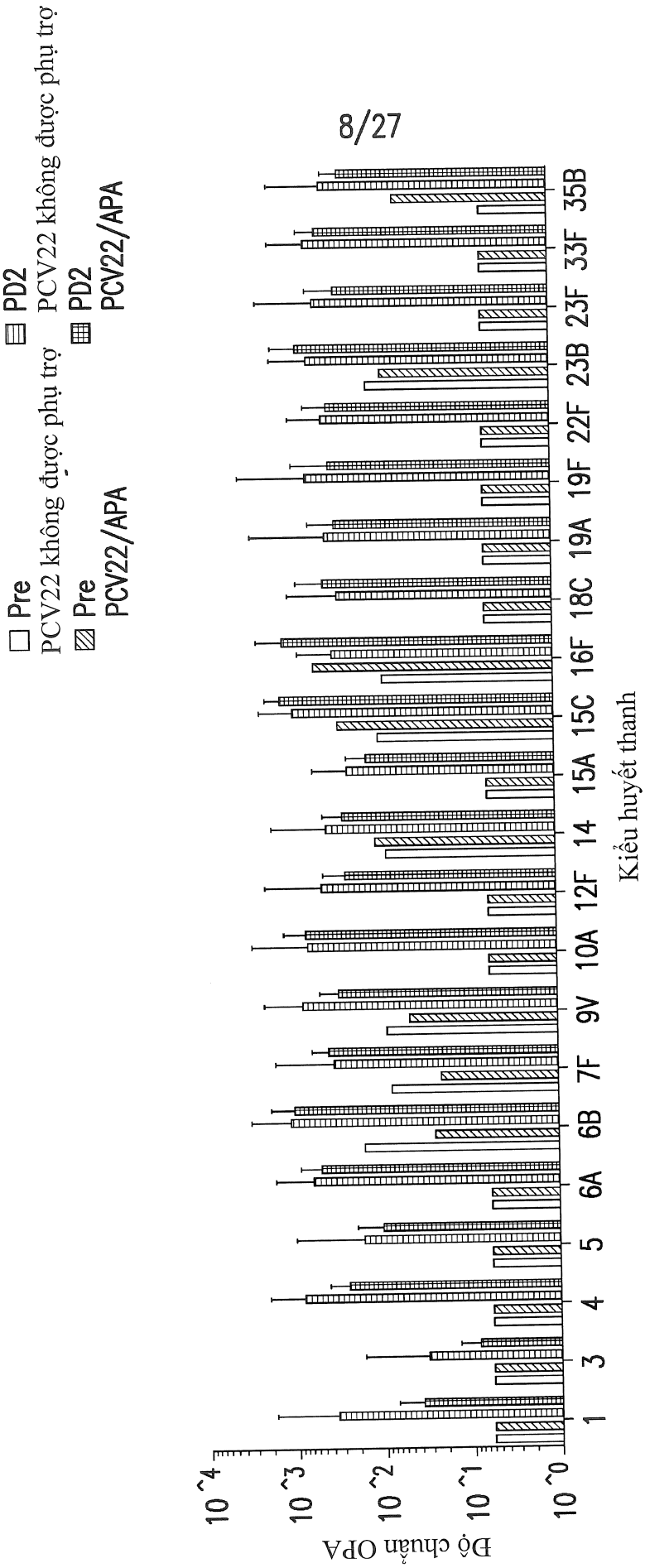
8/27
Pre
PCV22 không được phụ trợ
PD2
PCV22 không được phụ trợ
Pre
PCV22/APA
PD2
PCV22/APA
Độ chuẩn OPA
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
1
3
4
5
6A
6B
7F
9V
10A
12F
14
15A
15C
16F
18C
19A
19F
22F
23B
23F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.8

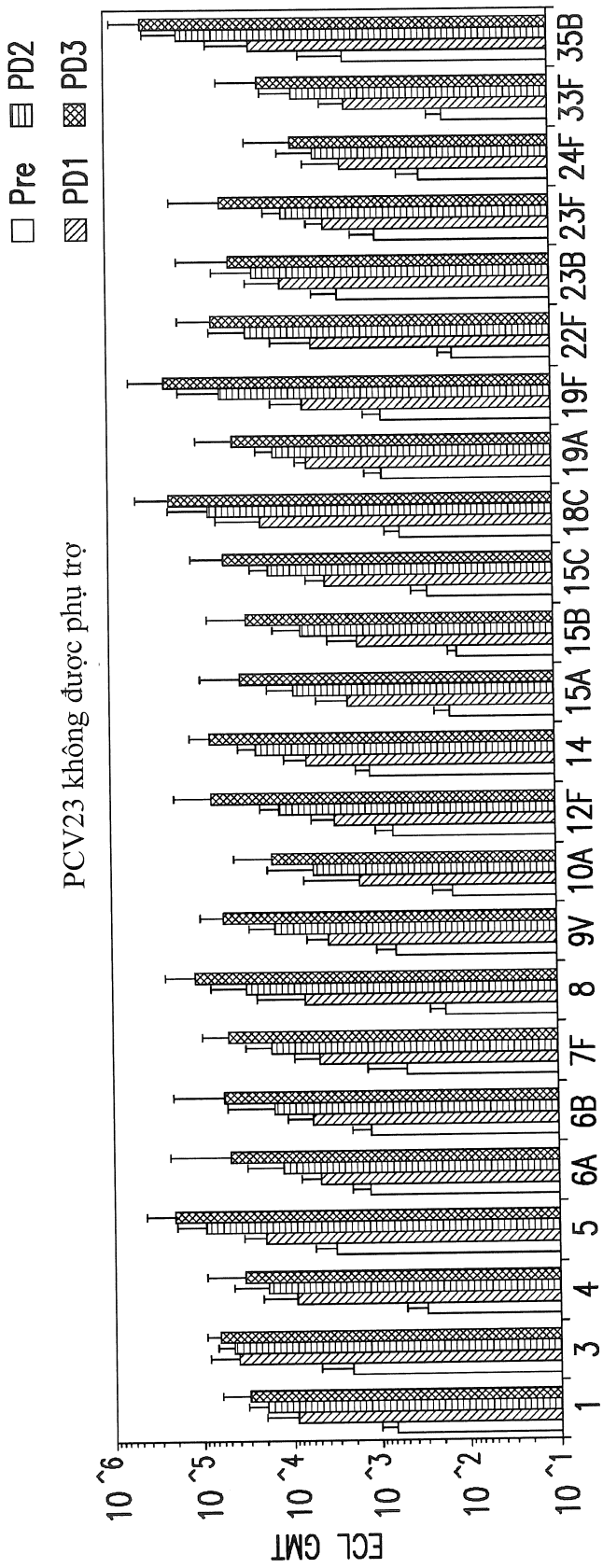
Pre
PD1
PD2
PD3
PCV23 không được phụ trợ
ECL GMT
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
1
3
4
5
6A
6B
7F
8
9V
10A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.9A

10/27

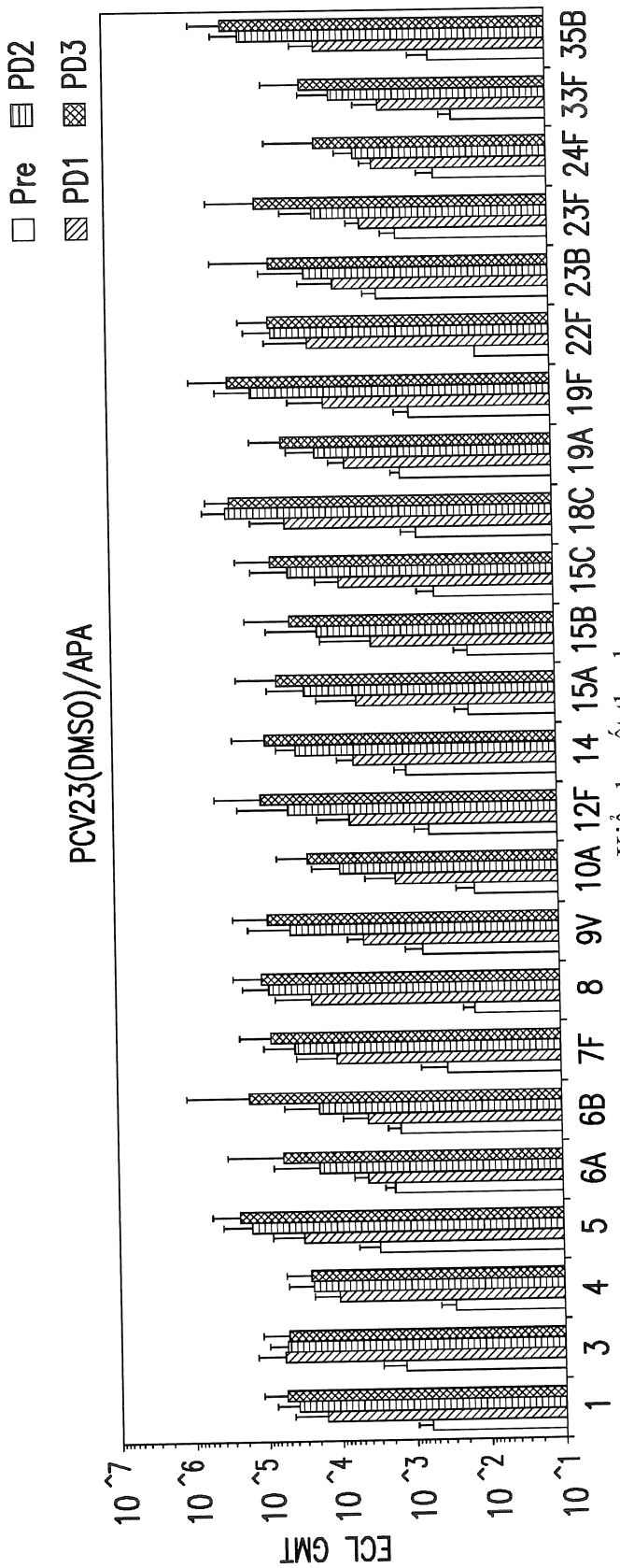
Pre
PD1
PD2
PD3
PCV23(DMSO)/APA
ECL GMT
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
1
3
4
5
6A
6B
7F
8
9V
10A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.9B

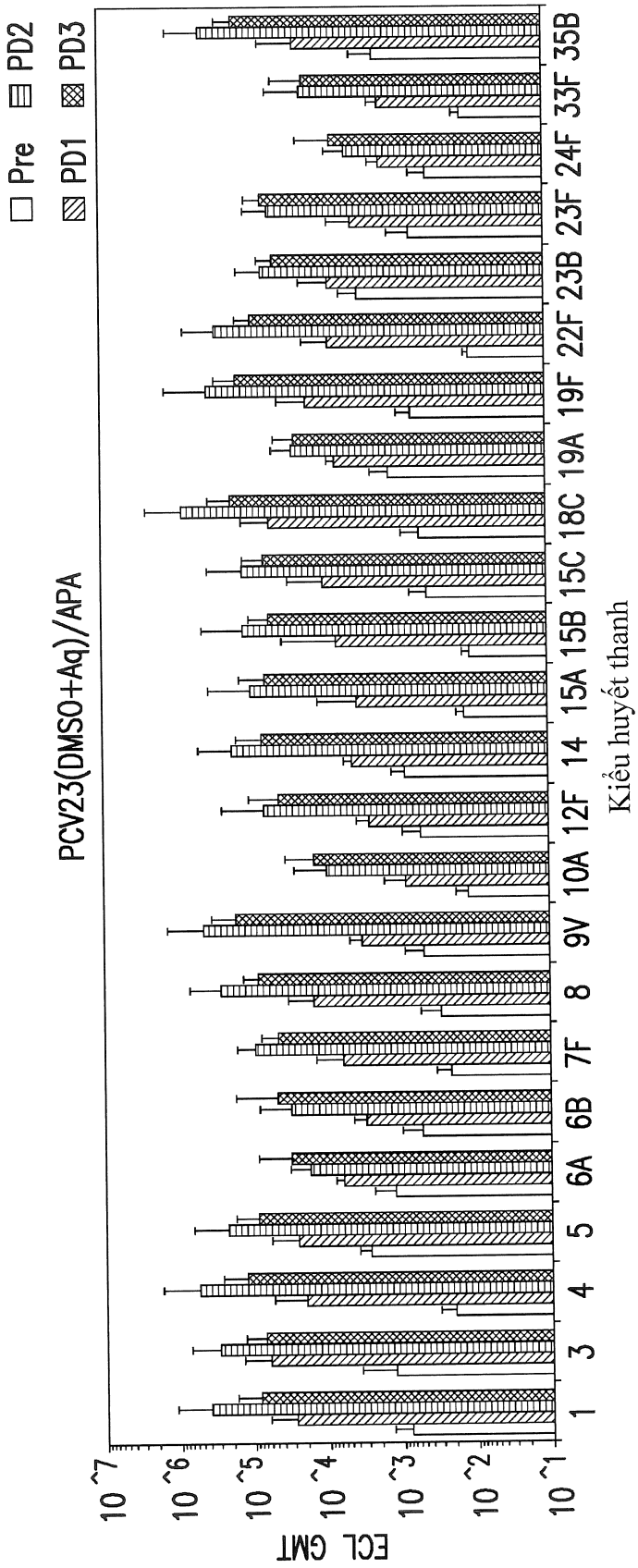
Pre
PD1
PD2
PD3
PCV23(DMSO+Aq)/APA
ECL GMT
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
1
3
4
5
6A
6B
7F
8
9V
10A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.9C

12/27

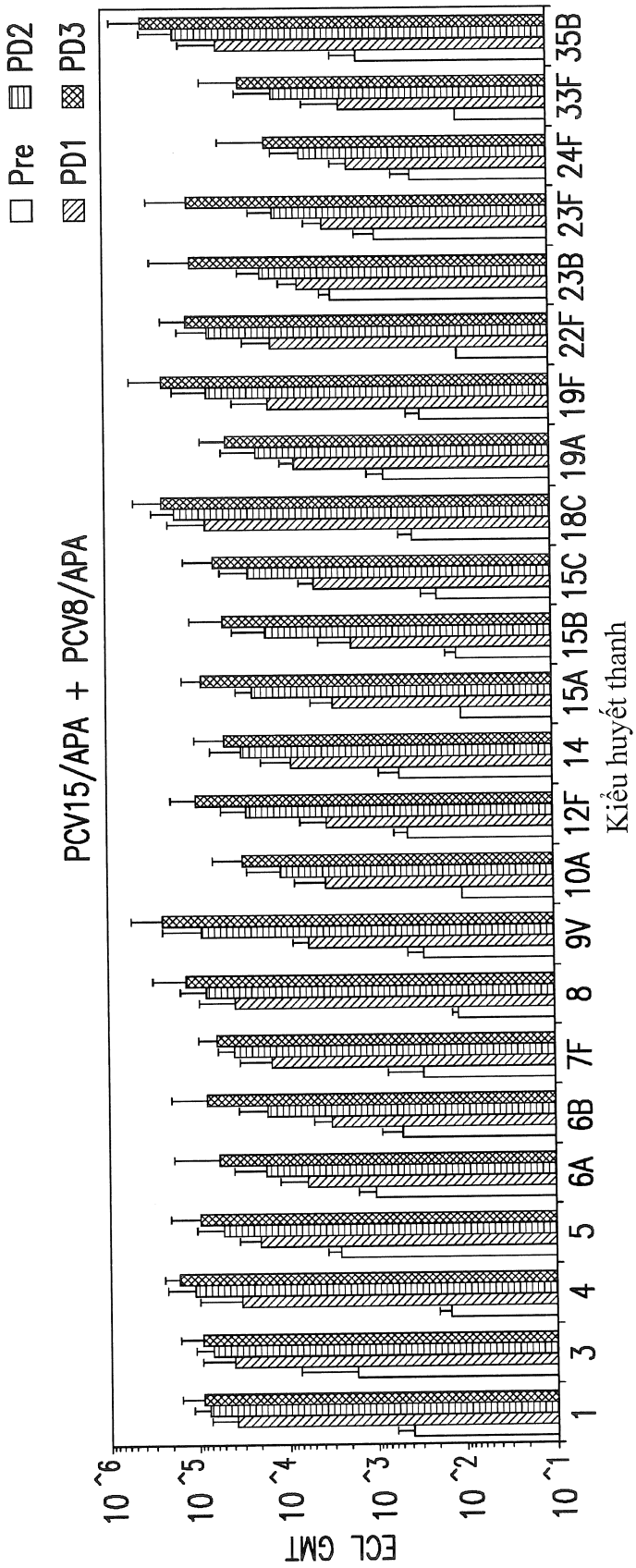
Pre
PD1
PD2
PD3
PCV15/APA + PCV8/APA
ECL GMT
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
1
3
4
5
6A
6B
7F
8
9V
10A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.9D

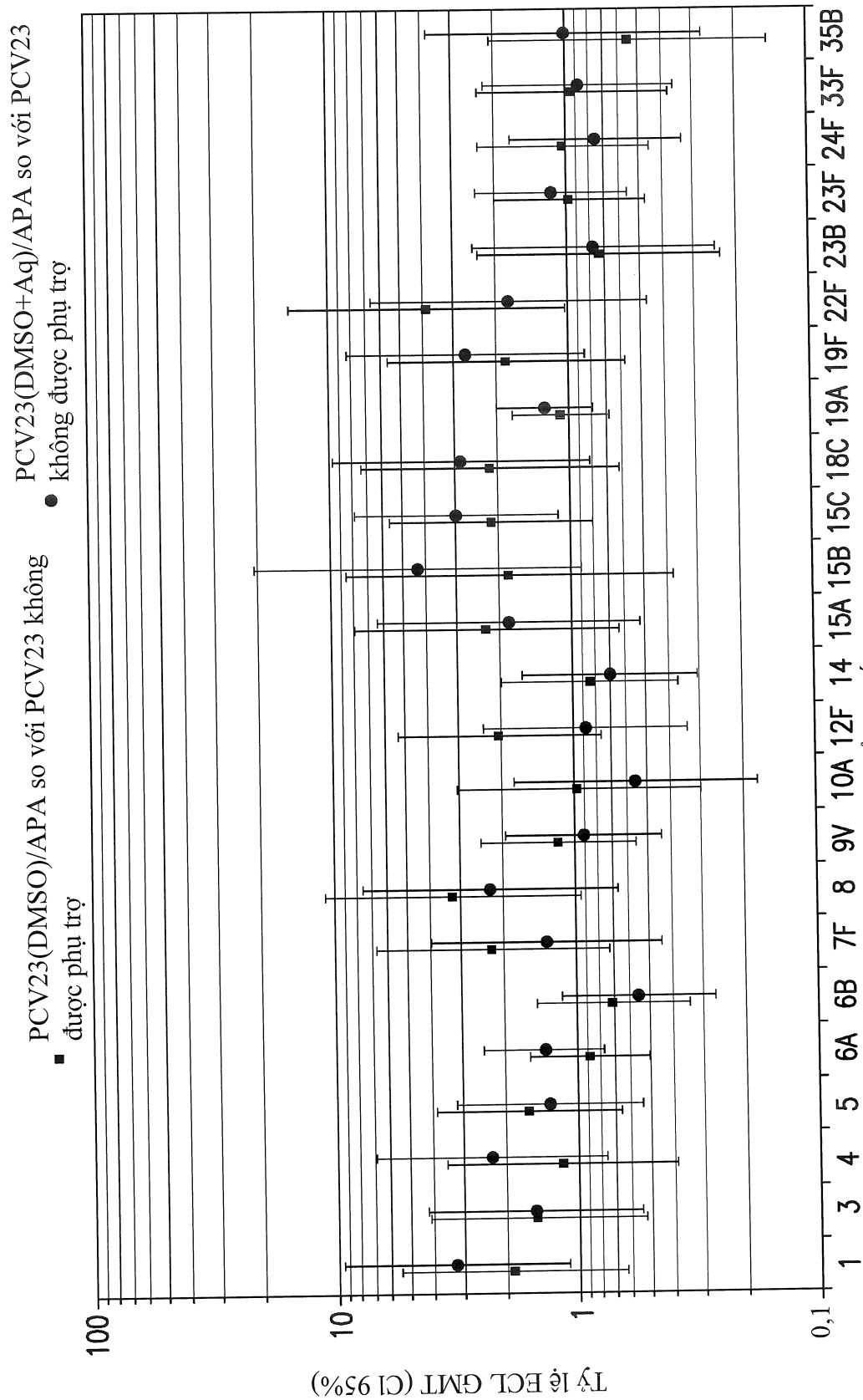
PCV23(DMSO)/APA so với PCV23 không được phụ trợ
PCV23(DMSO+Aq)/APA so với PCV23 không được phụ trợ
Tỷ lệ ECL GMT (CI 95%)
100
10
1
0,1
1 3 4 5 6A 6B 7F 8 9V 10A 12F 14 15A 15B 15C 18C 19A 19F 22F 23B 23F 24F 33F 35B
Kiểu huyết thanh

FIG.10A

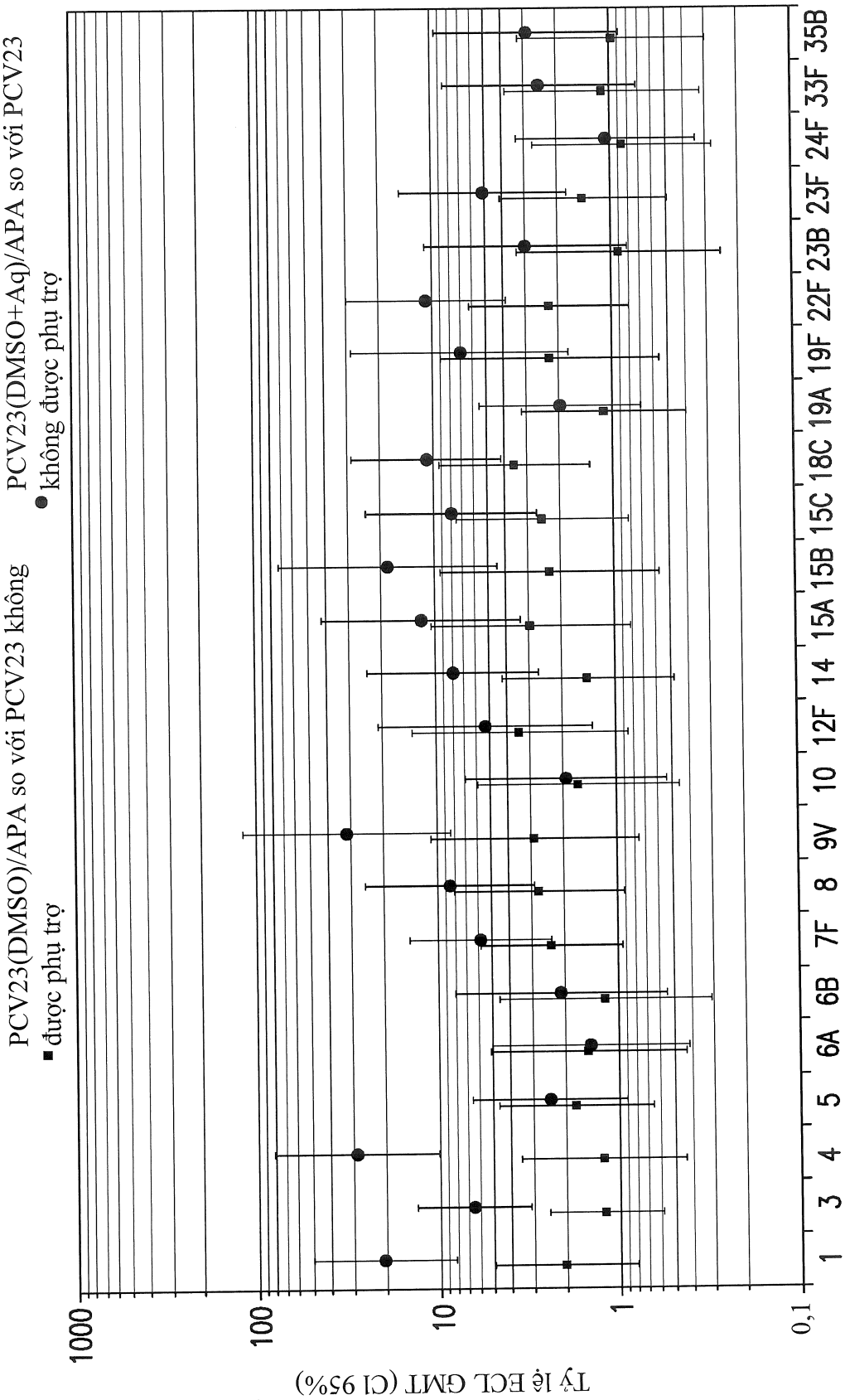
PCV23(DMSO)/APA so với PCV23 không
■ được phụ trợ
PCV23(DMSO+Aq)/APA so với PCV23
● không được phụ trợ
Tỷ lệ ECL GMT (CI 95%)
1000
100
10
1
0,1
1 3 4 5 6A 6B 7F 8 9V 10 12F 14 15A 15B 15C 18C 19A 19F 22F 23B 23F 24F 33F 35B
Kiểu huyết thanh

FIG.10B

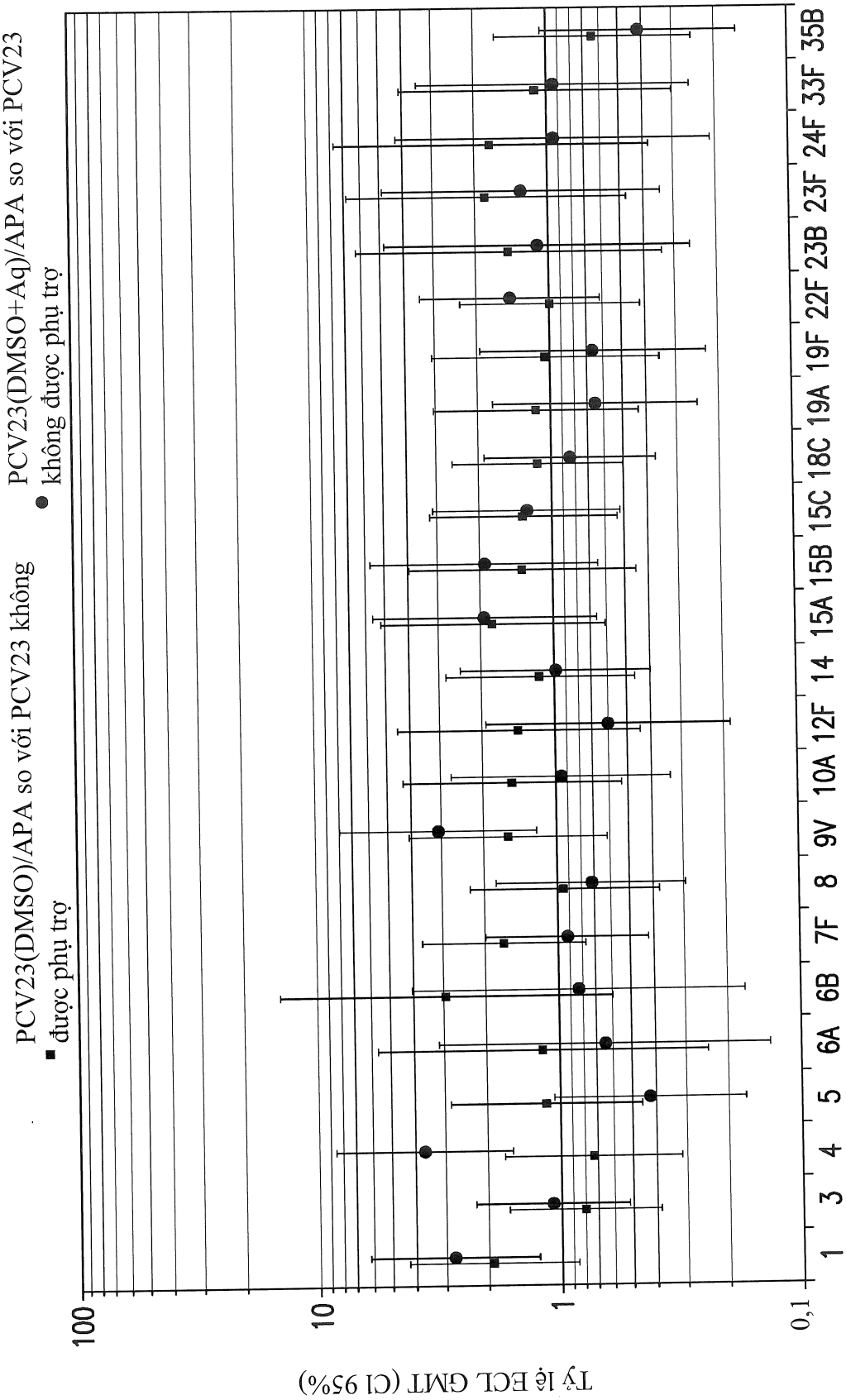
PCV23(DMSO)/APA so với PCV23 không
được phụ trợ
PCV23(DMSO+Aq)/APA so với PCV23
không được phụ trợ
Tỷ lệ ECL GMT (CI 95%)
100
10
1
0,1
1
3
4
5
6A
6B
7F
8
9V
10A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.10C

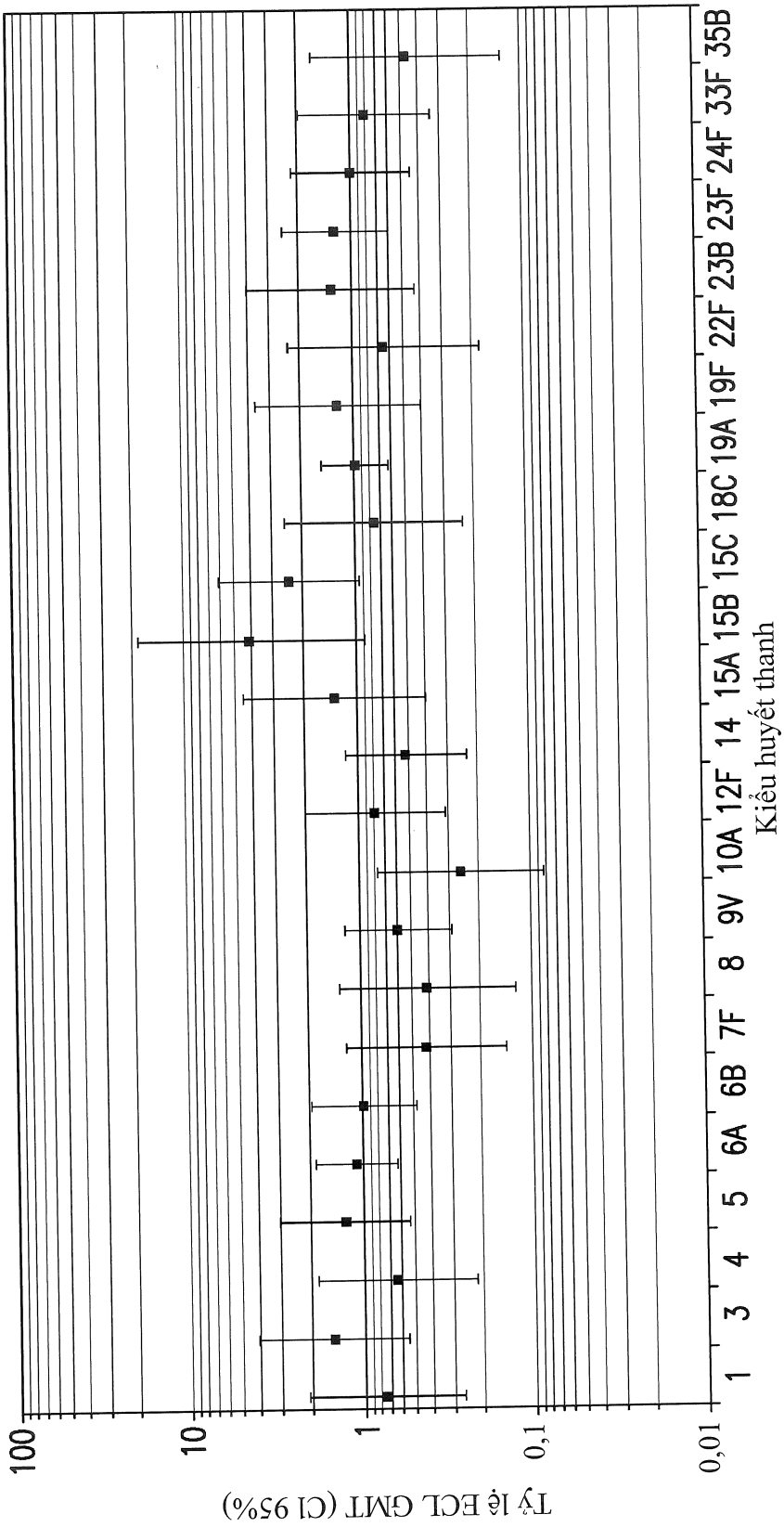
PCV23(DMSO+Aq)/APA và PCV15/APA + PCV8/APA
Tỷ lệ ECL GMT (CI 95%)
100
10
1
0,1
0,01
1 3 4 5 6A 6B 7F 8 9V 10A 12F 14 15A 15B 15C 18C 19A 19F 22F 23B 23F 24F 33F 35B
Kiểu huyết thanh

FIG.11A

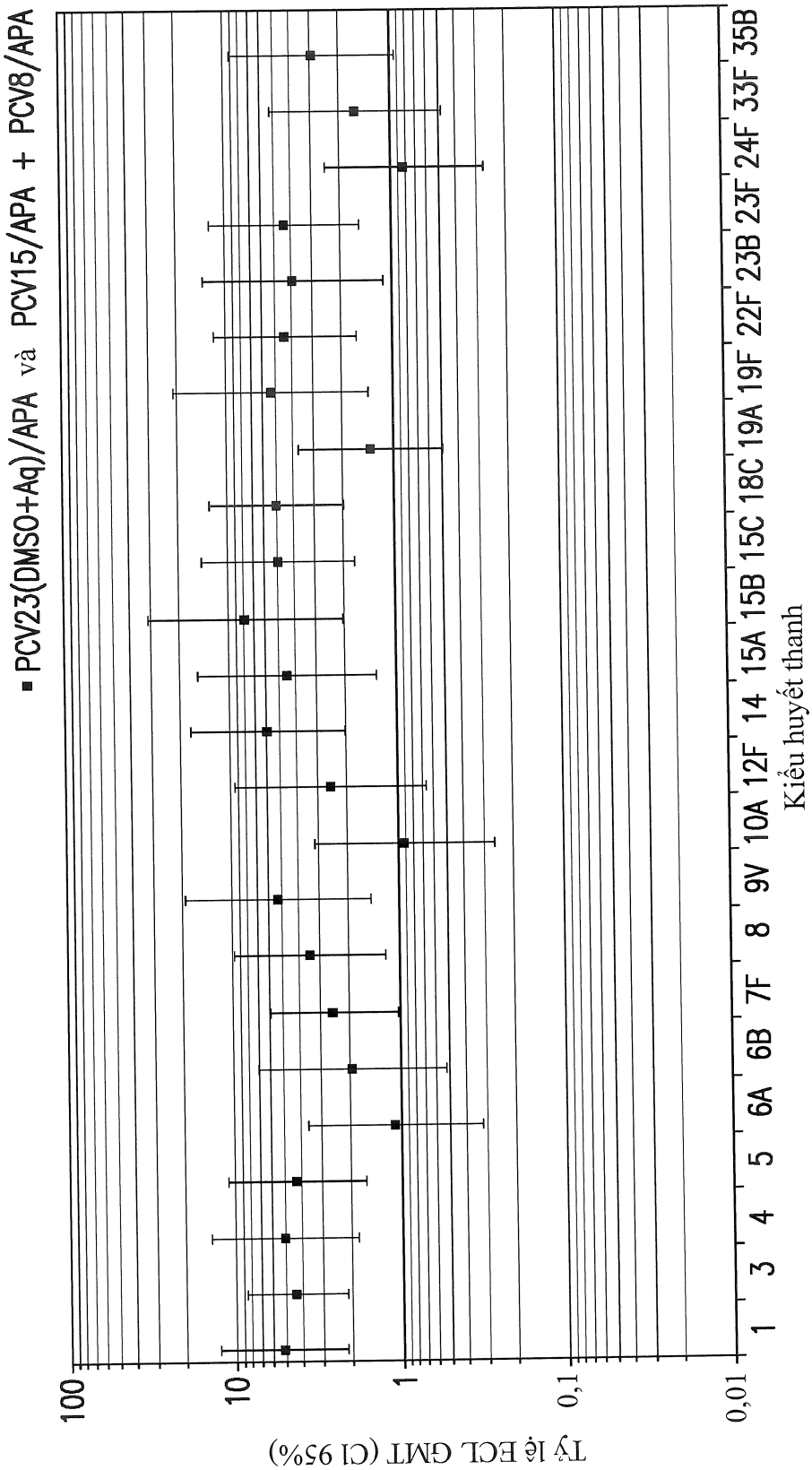
■ PCV23(DMSO+Aq)/APA và PCV15/APA + PCV8/APA
Tỷ lệ ECL GMT (CI 95%)
100
10
1
0,1
0,01
1
3
4
5
6A
6B
7F
8
9V
10A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.11B

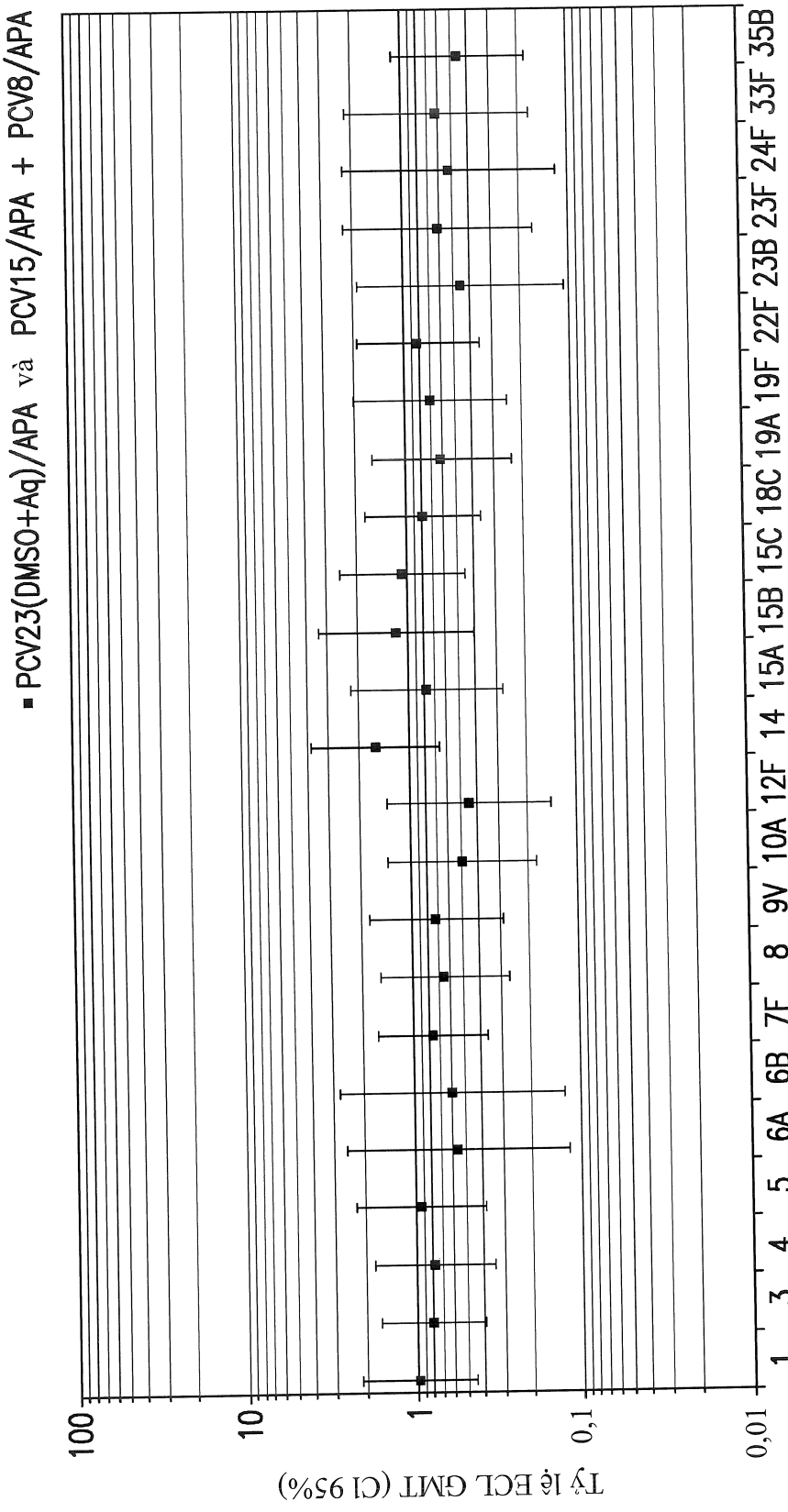
■ PCV23(DMSO+Aq)/APA và PCV15/APA + PCV8/APA
Tỷ lệ ECL GMT (CI 95%)
100
10
1
0,1
0,01
1 3 4 5 6A 6B 7F 8 9V 10A 12F 14 15A 15B 15C 18C 19A 19F 22F 23B 23F 24F 33F 35B
Kiểu huyết thanh

FIG.11C

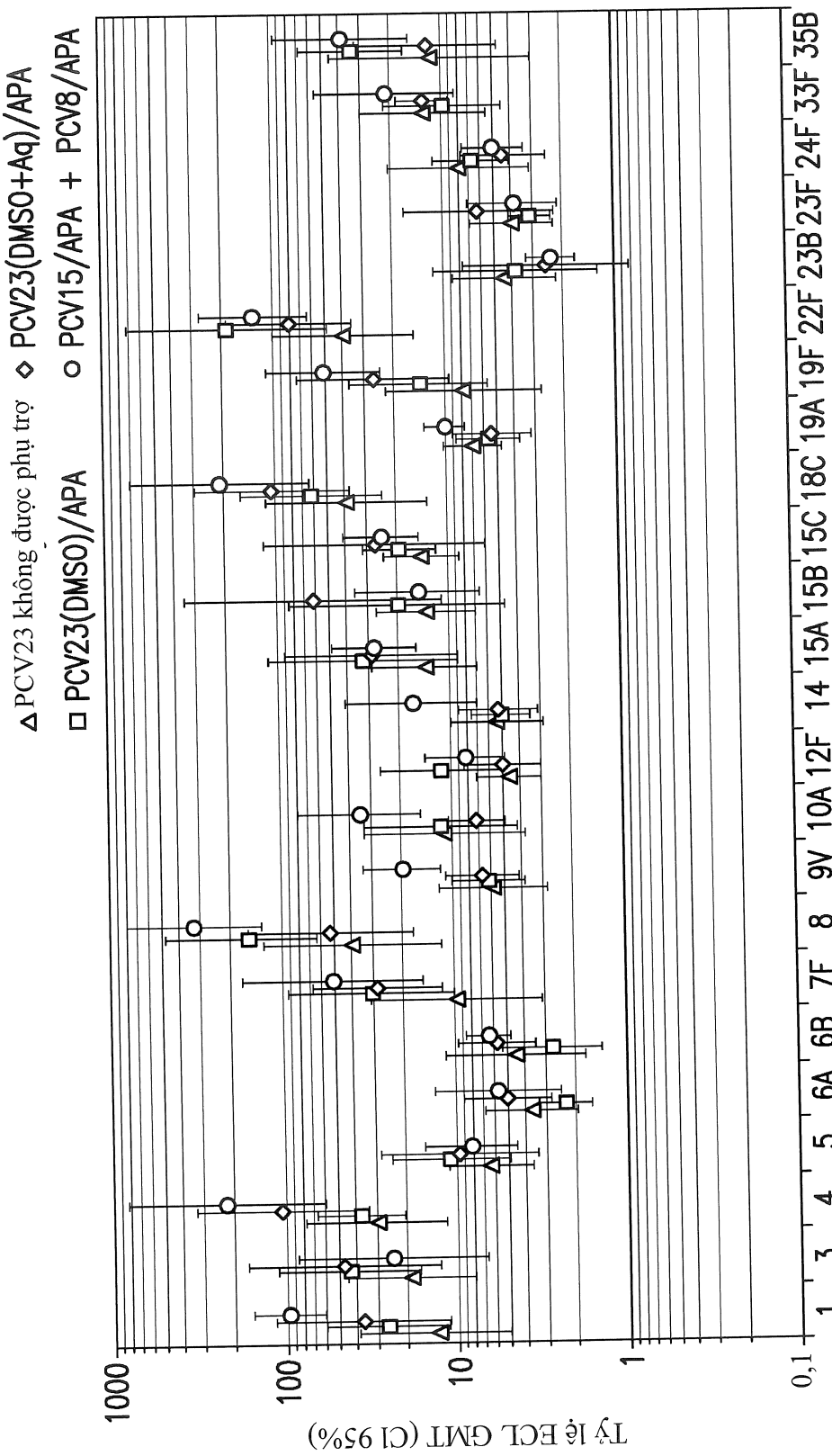
△ PCV23 không được phụ trợ
◇ PCV23(DMSO+Aq)/APA
□ PCV23(DMSO)/APA
○ PCV15/APA + PCV8/APA
Tỷ lệ ECL GMT (CI 95%)
1000
100
10
1
0,1
1
3
4
5
6A
6B
7F
8
9V
10A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.12A

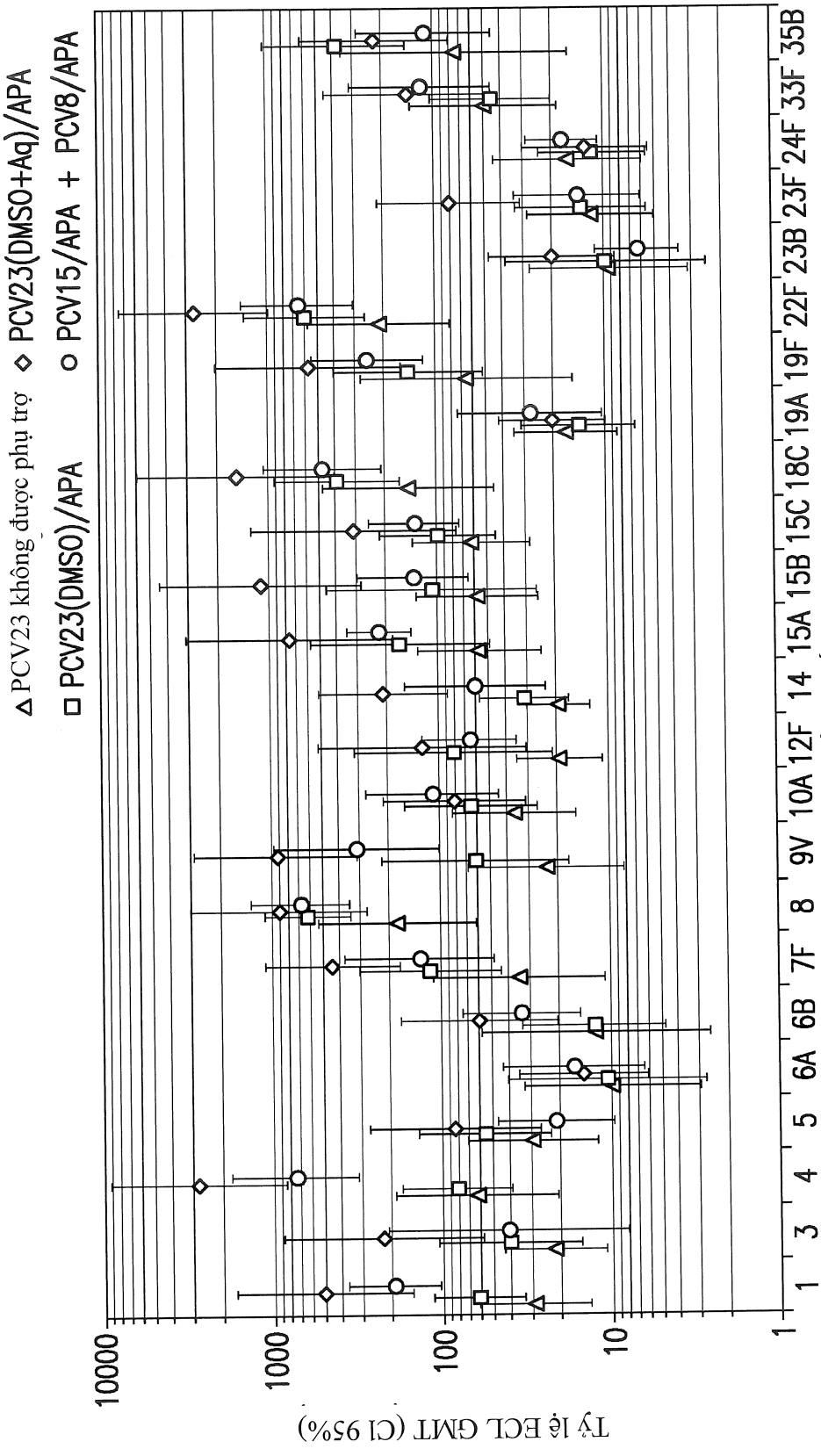
PCV23 không được phụ trợ
PCV23(DMSO+Aq)/APA
PCV23(DMSO)/APA
PCV15/APA + PCV8/APA
Tỷ lệ ECL GMT (CI 95%)
10000
1000
100
10
1
1 3 4 5 6A 6B 7F 8 9V 10A 12F 14 15A 15B 15C 18C 19A 19F 22F 23B 23F 24F 33F 35B
Kiểu huyết thanh

FIG.12B

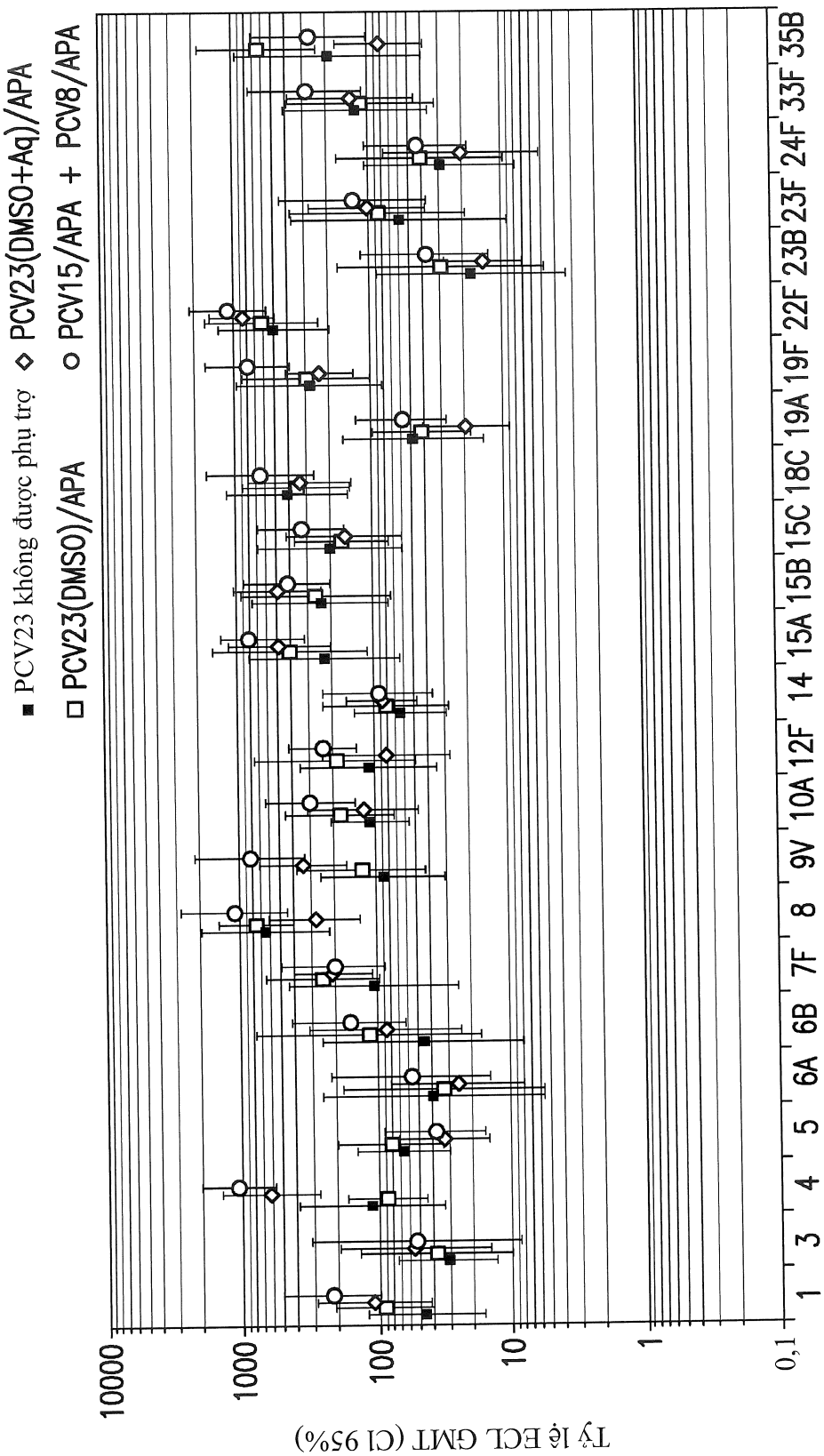
■ PCV23 không được phụ trợ ◇ PCV23(DMSO+Aq)/APA
□ PCV23(DMSO)/APA ○ PCV15/APA + PCV8/APA
Tỷ lệ ECL GMT (CI 95%)
10000
1000
100
10
1
0,1
1 3 4 5 6A 6B 7F 8 9V 10A 12F 14 15A 15B 15C 18C 19A 19F 22F 23B 23F 24F 33F 35B
Kiểu huyết thanh

FIG.12C

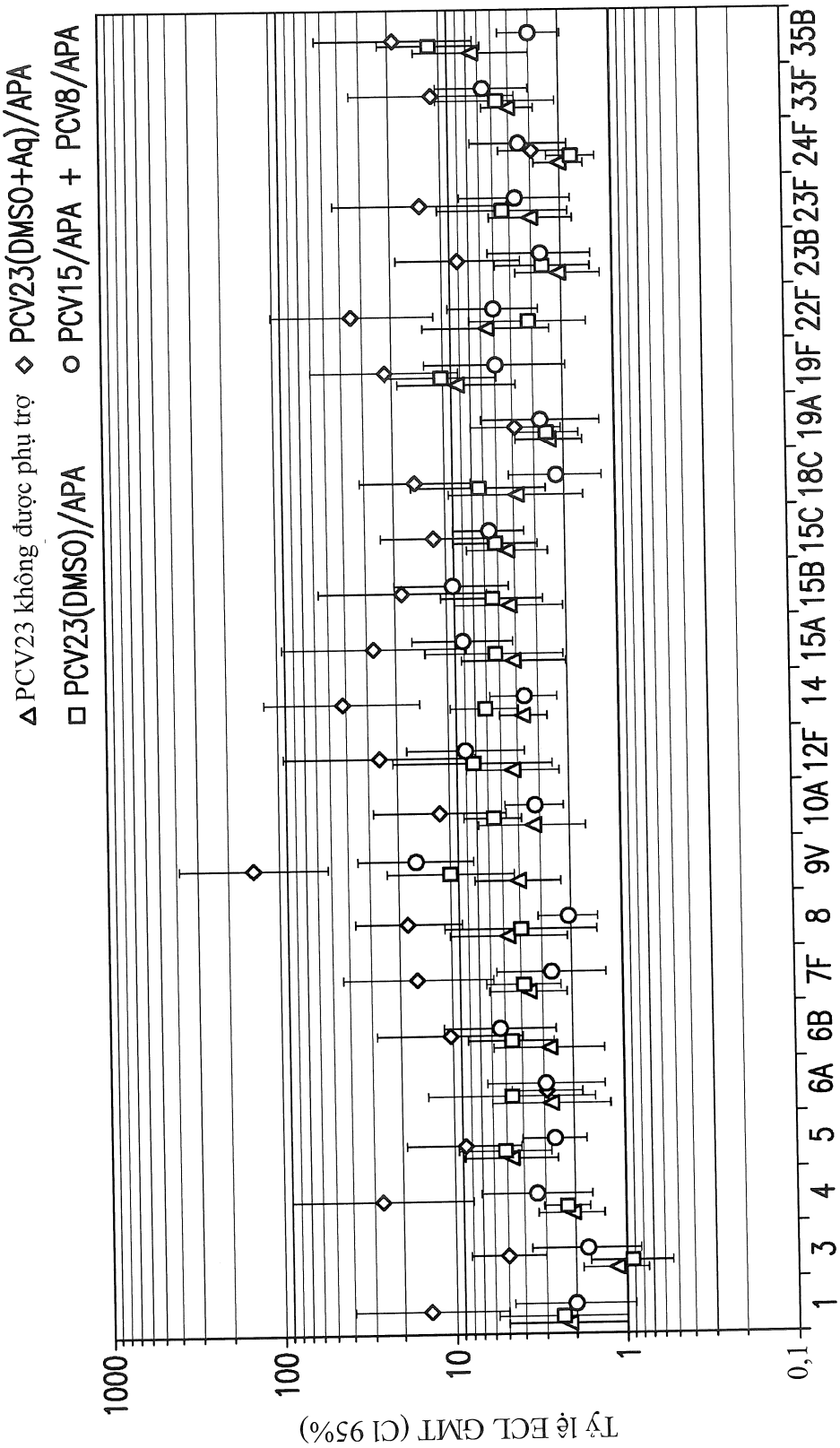
△ PCV23 không được phụ trợ
◇ PCV23(DMSO+Aq)/APA
□ PCV23(DMSO)/APA
○ PCV15/APA + PCV8/APA
Tỷ lệ ECL GMT (CI 95%)
1000
100
10
1
0,1
1
3
4
5
6A
6B
7F
8
9V
10A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.12D

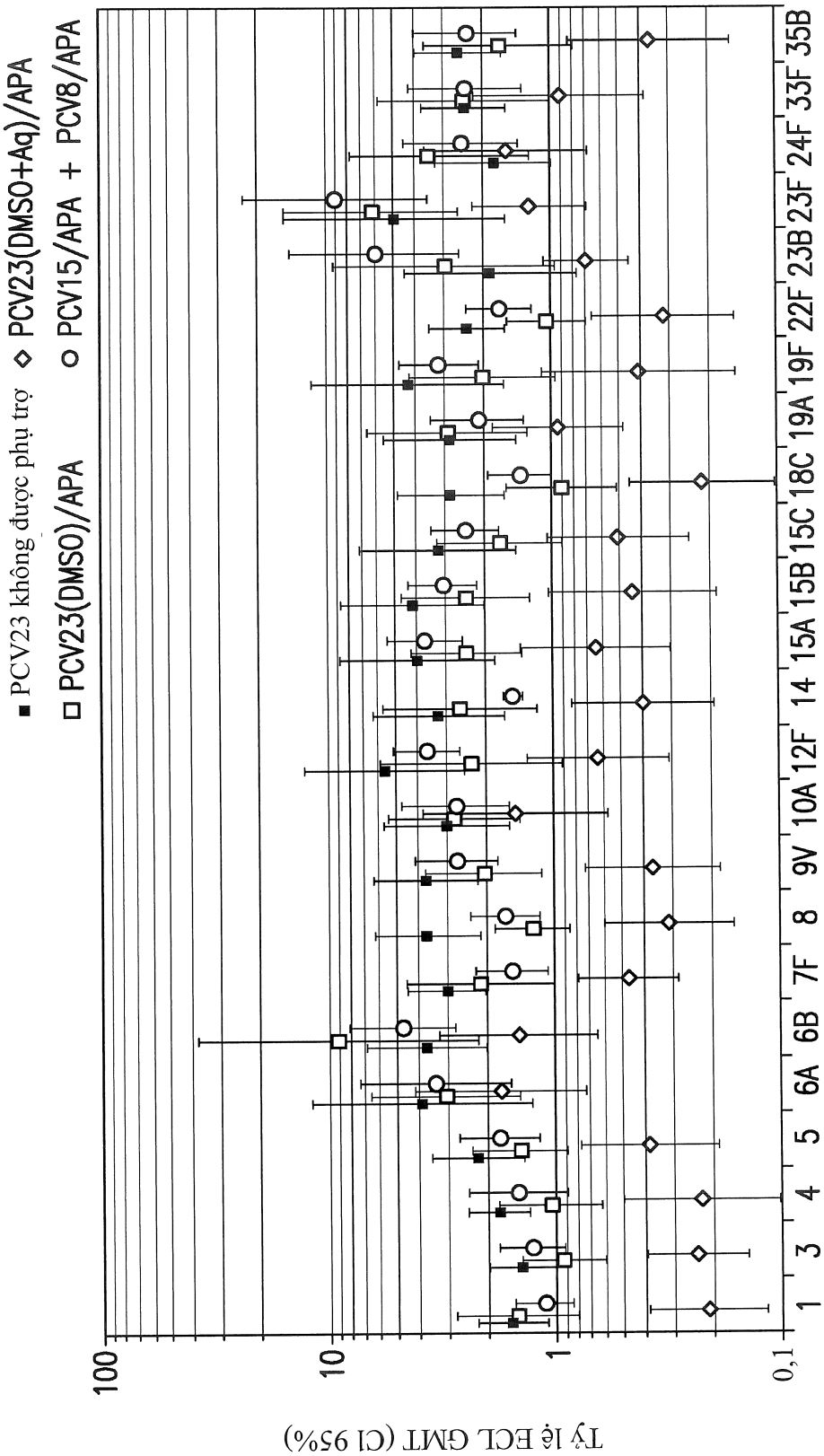
■ PCV23 không được phụ trợ
◇ PCV23(DMSO+Aq)/APA
□ PCV23(DMSO)/APA
○ PCV15/APA + PCV8/APA
Tỷ lệ ECL GMT (CI 95%)
100
10
1
0,1
1
3
4
5
6A
6B
7F
8
9V
10A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.12E

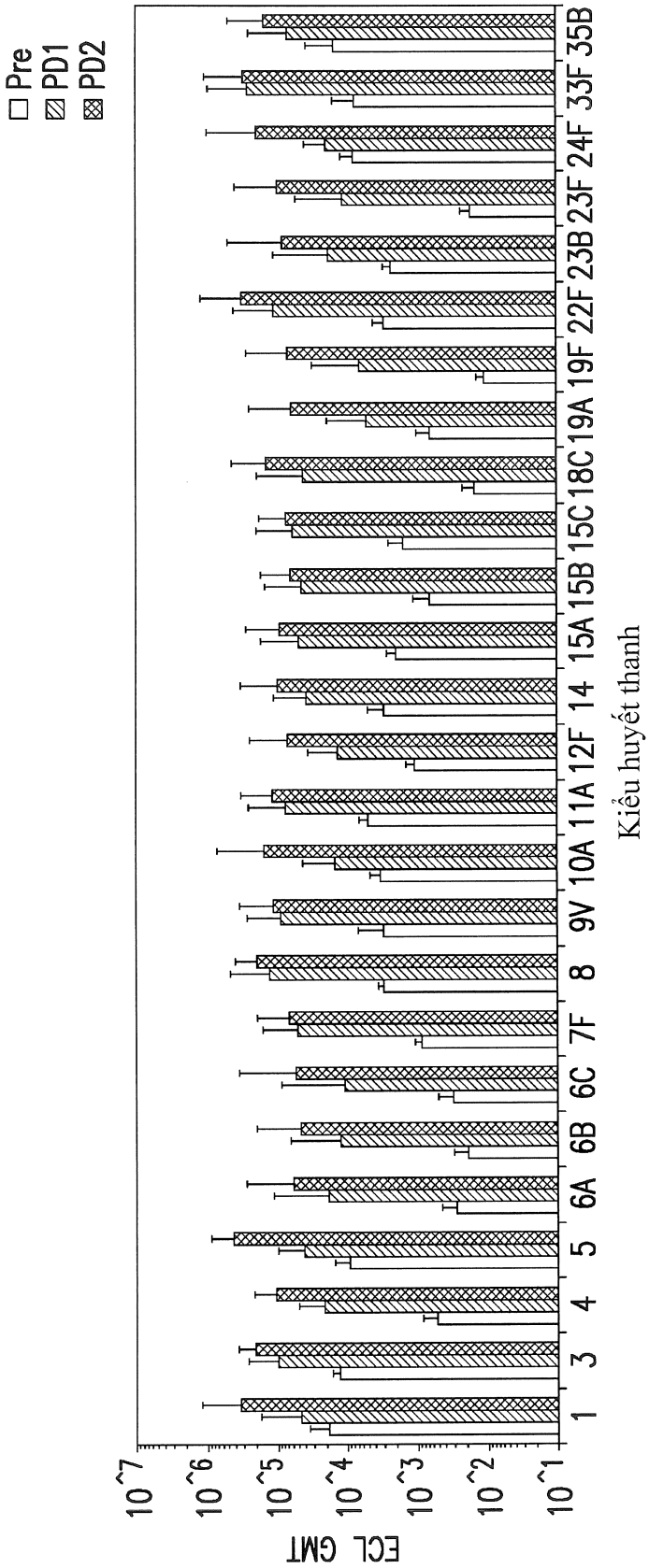
Pre
PD1
PD2
ECL GMT
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
1
3
4
5
6A
6B
6C
7F
8
9V
10A
11A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.13A

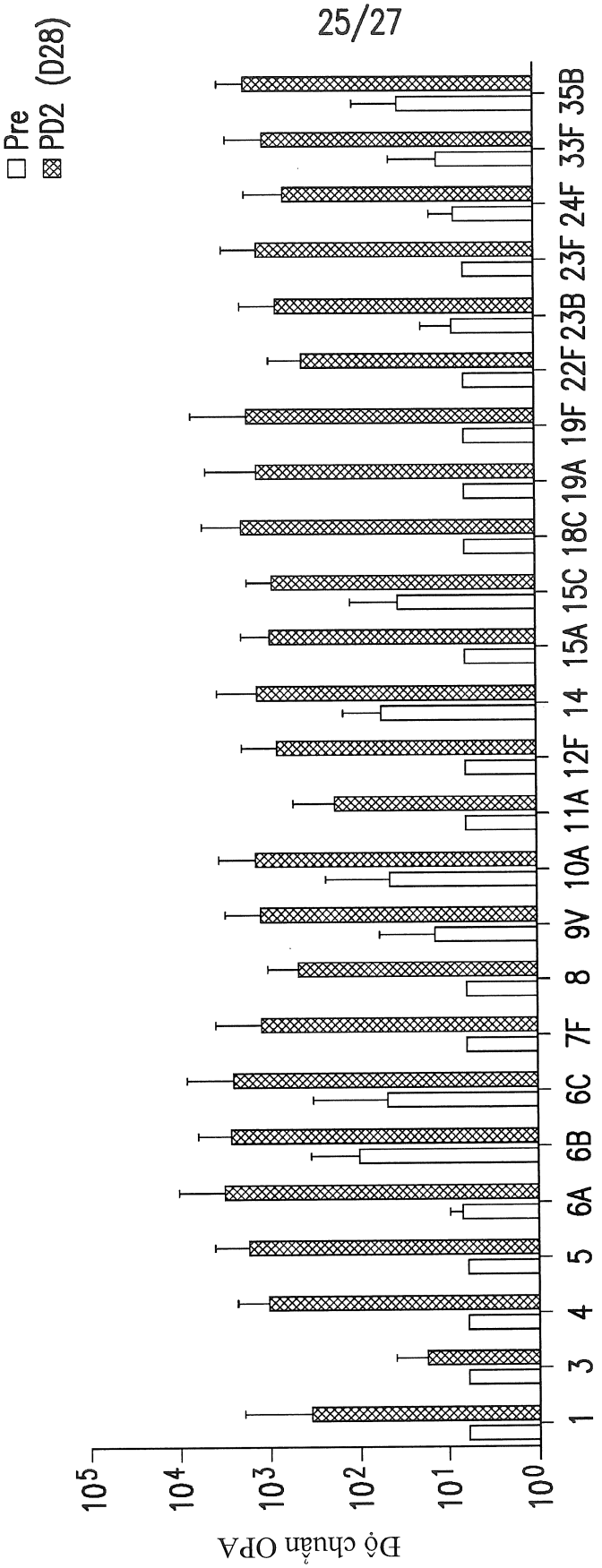
Pre
PD2 (D28)
Độ chuẩn OPA
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
1
3
4
5
6A
6B
6C
7F
8
9V
10A
11A
12F
14
15A
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.13B

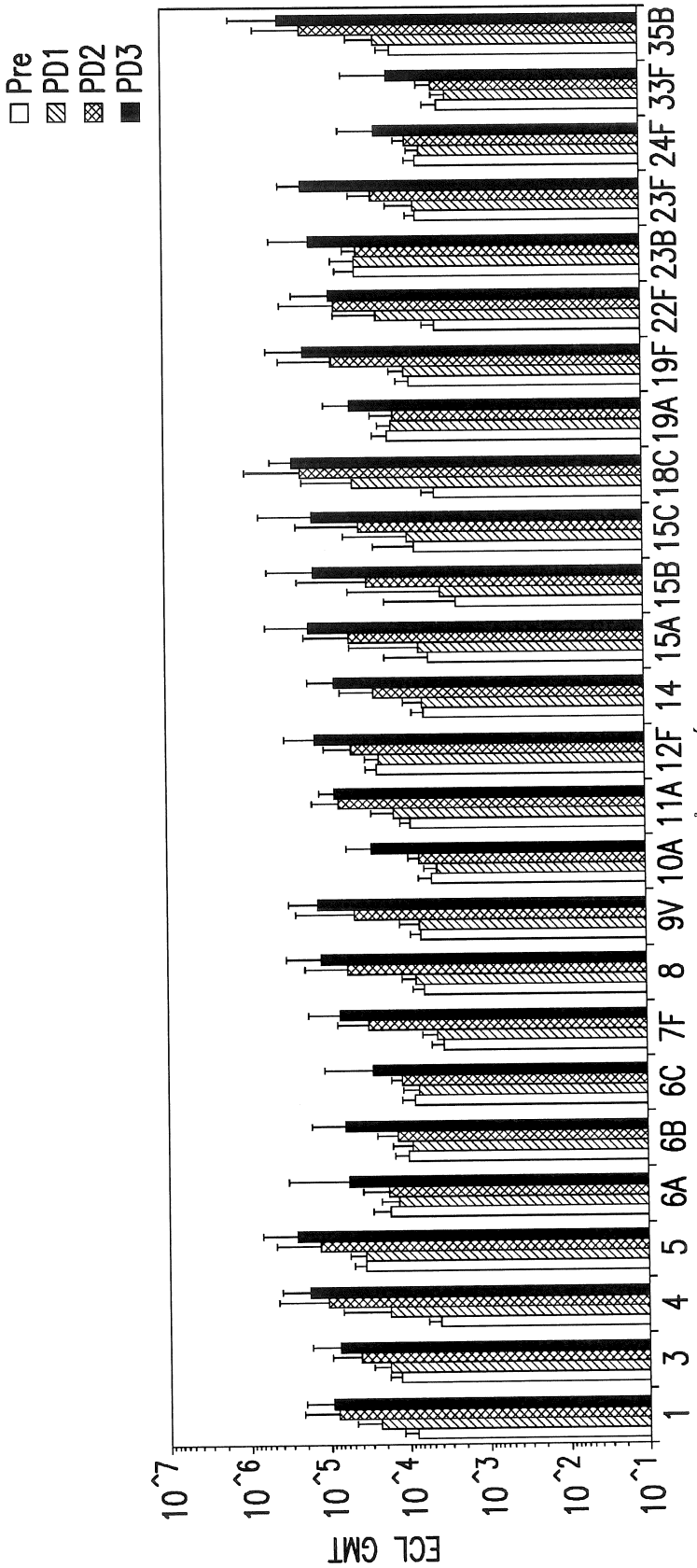
Pre
PD1
PD2
PD3
ECL GMT
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
1
3
4
5
6A
6B
6C
7F
8
9V
10A
11A
12F
14
15A
15B
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.14A

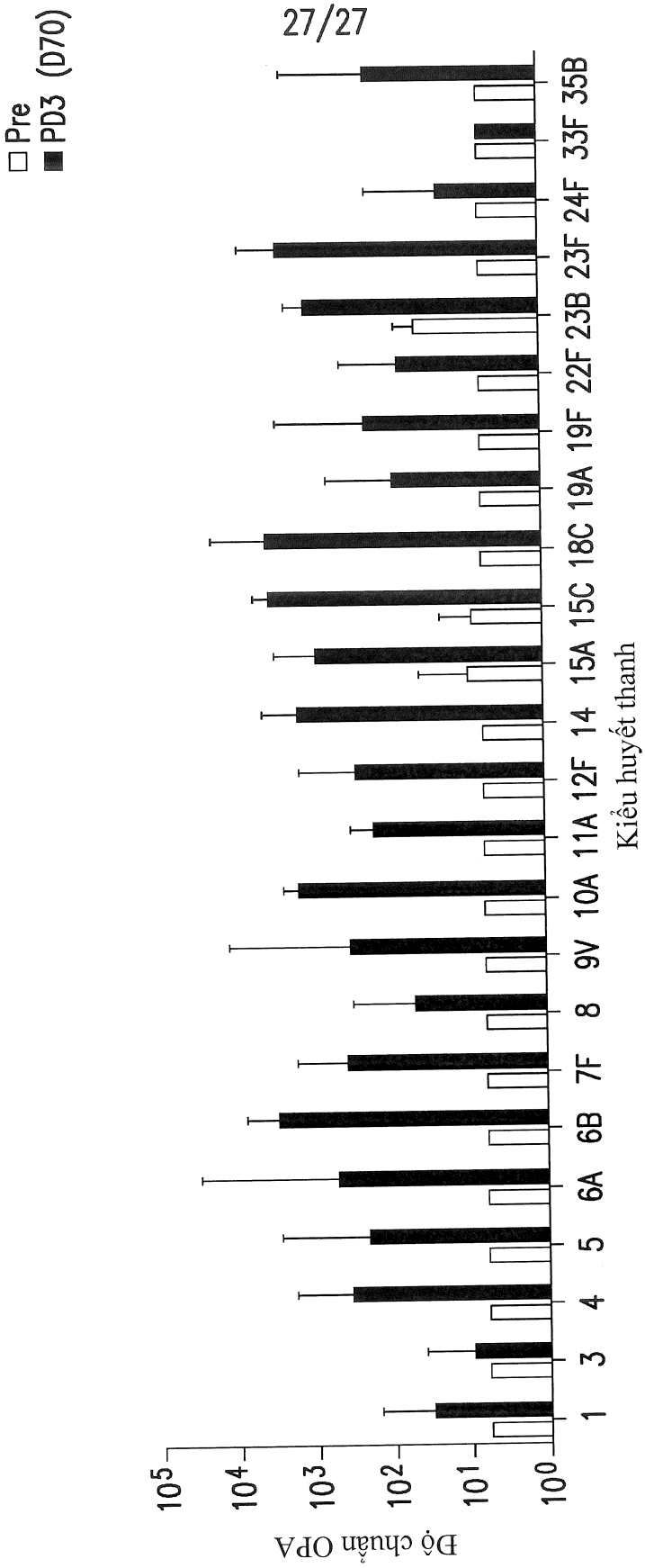
27/27
Pre
PD3 (D70)
Độ chuẩn OPA
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
1
3
4
5
6A
6B
7F
8
9V
10A
11A
12F
14
15A
15C
18C
19A
19F
22F
23B
23F
24F
33F
35B
Kiểu huyết thanh

FIG.14B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Merck Sharp & Dohme Corp.
Abeygunawardana, Chitrananda
Cui, Yadong Adam
Ferrero, Romulo
He, Jian
Musey, Luwy
Petigara, Tanaz
Skinner, Julie M.

<120> CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH ĐA HÓA TRỊ CHỨA THỂ LIÊN HỢP POLYSACARIT PROTEIN MANG STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

<130> 24683-WO-PCT

<150> 62/853,331
<151> 2019-05-28

<150> 62/781,835
<151> 2018-12-19

<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 tố 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
```