



(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)



1-0025346

(51)⁷ A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2012-02299

(22) 03/02/2011

(86) PCT/US2011/023526 03/02/2011

(87) WO2011/100151 18/08/2011

(30) 61/302,726 09/02/2010 US

(45) 25/09/2020 390

(43) 25/01/2013 298A

(73) MERCK SHARP & DOHME CORP. (US)

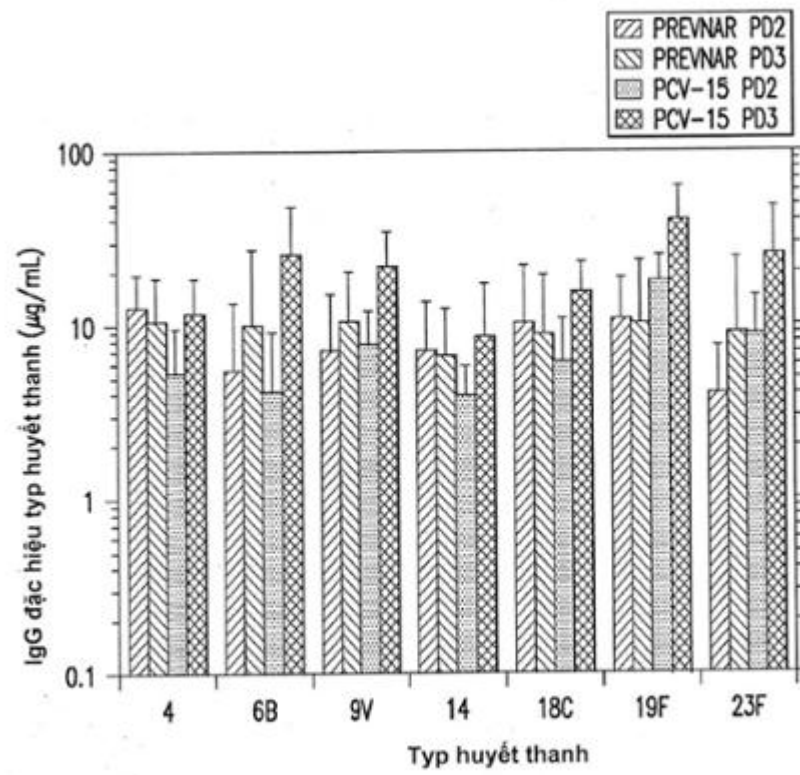
126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907, United States of America

(72) CAULFIELD, Michael, J. (US); AHL, Patrick, L. (US); BLUE, Jeffrey, T. (US); CANNON, Jayme, L. (US).

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

(54) CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH CHỨA THỂ LIÊN HỢP POLYSACARIT -
PROTEIN PHẾ CẦU KHUẨN 15 GIÁ

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa giá chứa 15 thể liên hợp polysacarit-protein khác nhau. Mỗi thể liên hợp cấu tạo từ polysacarit vỏ thu được từ các typ huyết thanh khác nhau của *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F hoặc 33F) được liên hợp với protein mang, tốt hơn nếu là CRM₁₉₇. Chế phẩm sinh miễn dịch này tốt hơn nếu được bào chế dưới dạng vacxin sử dụng chất phụ trợ gốc nhôm, tạo ra phổ kháng bệnh rộng đối với các bệnh phế cầu khuẩn gây ra, cụ thể là ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa giá chứa 15 thể liên hợp polysacarit-protein khác nhau. Mỗi thể liên hợp bao gồm polysacarit vỏ được tạo ra từ nhiều typ huyết thanh khác nhau của *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F hoặc 33F) được liên hợp với protein mang, tốt hơn nếu là CRM₁₉₇. Chế phẩm sinh miễn dịch này, tốt hơn nếu là được bào chế dưới dạng vacxin trên chất phụ trợ gốc nhôm, tạo ra phổ kháng bệnh rộng đối với các bệnh do phế cầu khuẩn gây ra, cụ thể là ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Streptococcus pneumoniae là nguyên nhân chính gây ra bệnh nghiêm trọng trên thế giới. Trong năm 1997, Trung tâm kiểm soát và ngăn ngừa bệnh – (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) đã ước tính rằng hằng năm ở Mỹ có 3.000 trường hợp mắc bệnh viêm màng não do phế cầu khuẩn, 50.000 trường hợp nhiễm trùng huyết do phế cầu khuẩn, 7.000.000 trường hợp viêm tai giữa do phế cầu khuẩn và 500.000 trường hợp viêm phổi do phế cầu khuẩn. Xem tài liệu: Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997, 46(RR-8):1-13. Ngoài ra, biến chứng của các bệnh này có thể cũng gây hậu quả đáng kể với một số nghiên cứu báo cáo đã cho thấy có đến 8% trường hợp tử vong và 25% trường hợp bị dị tật thần kinh do bệnh viêm màng não do phế cầu khuẩn gây ra. Xem tài liệu: Arditi *et al.*, 1998, Pediatrics 102:1087-97.

Các vacxin đa giá chứa polysacarit phế cầu khuẩn đã được cấp phép trong nhiều năm qua đã cho thấy chúng có giá trị trong việc ngăn ngừa bệnh do phế cầu khuẩn gây ra ở người lớn, cụ thể là nhóm người già và nhóm người có nguy cơ mắc bệnh cao. Tuy nhiên, trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ thường đáp ứng kém với polysacarit phế cầu khuẩn chưa liên hợp. Trong hoàn cảnh đó, vacxin chứa thể liên hợp phế cầu khuẩn, Prevnar®, chứa 7 typ huyết thanh được phân lập nhiều nhất (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F và 23F) và là nguyên nhân gây ra bệnh phế cầu khuẩn không xâm lấn ở trẻ nhỏ và trẻ sơ sinh lần đầu tiên đã được cấp giấy phép ở Mỹ vào tháng 2 năm 2000. Sau khi Prevnar® được sử dụng phổ biến ở Mỹ, các bệnh không xâm lấn do

phế cầu khuẩn gây ra ở trẻ em do các typ huyết thanh có mặt trong Prevnar® đã giảm đi đáng kể. Xem tài liệu: Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005, 54(36):893-7. Tuy nhiên, có một số hạn chế liên quan đến việc phổ biến các typ huyết thanh bằng Prevnar® ở một số vùng nhất định trên thế giới và có một số bằng chứng cho thấy sự xuất hiện của một số typ huyết thanh mới ở Mỹ (ví dụ, 19A và các typ khác). Xem 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 yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2006/0228380 A1 mô tả vaccin chứa thể liên hợp polysaccharit-protein phế cầu khuẩn 13 giá bao gồm typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F. Công bố đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN 101590224 mô tả vaccin chứa thể liên hợp polysaccharit-protein phế cầu khuẩn 14 giá bao gồm typ huyết thanh 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F.

Các PCV khác đã bao gồm 7, 10, 11, hoặc 13 typ huyết thanh có mặt trong PCV-15, nhưng đã quan sát thấy có can thiệp miễn dịch đối với một số typ huyết thanh (ví dụ, mức bảo vệ thấp hơn đối với typ huyết thanh 3 trong PCV-11 của GSK) và tỷ lệ đáp ứng thấp hơn đối với typ huyết thanh 6B trong PCV-13 của Pfizer. 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 4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlers, được trình bày trong cuộc họp thường niên lần thứ 48 của ICAAC/thứ 46 của ISDA, Washington DC, October 25-28, 2008.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm (1) hỗn hợp thể liên hợp polysaccharit-protein đa giá bao gồm các polysaccharit vỏ từ 15 typ huyết thanh khác nhau của *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang, và (2) chất mang được dụng. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin chứa thể liên hợp phế cầu khuẩn 15 giá (PCV-15) bao gồm hỗn hợp các thể liên hợp polysaccharit-protein đa giá bao gồm các polysaccharit vỏ từ các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V,

14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F của *S. pneumoniae* được liên hợp với protein mang; và chất mang được dùng. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm sinh miễn dịch chứa polysaccharit vỏ từ các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F và protein mang là CRM₁₉₇.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm nêu trên còn bao gồm chất phụ trợ. Theo các phương án nhất định, chất phụ trợ là chất phụ trợ gốc nhôm, như nhôm phosphat, nhôm sulfat hoặc nhôm hydroxyt. Theo phương án cụ thể của sáng chế, chất phụ trợ là nhôm phosphat.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch đối với polysaccharit vỏ của *S. pneumoniae*, bao gồm việc cho người dùng lượng gây miễn dịch hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch được sử dụng dưới dạng liều đơn 0,5 mL được bào chế để chứa: 2 µg mỗi polysaccharit, ngoại trừ đối với 6B là 4 µg; khoảng 32 µg protein mang CRM₁₉₇; 0,125mg chất phụ trợ là nhôm nguyên tố (0,5mg nhôm phosphat); natri clorua 150mM và đệm L-histidin 20mM.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự so sánh nồng độ trung bình hình học (GMC) của PCV-15 với Prevnar® ở các con khỉ đầu chó đầu chó sơ sinh (các typ huyết thanh trong Prevnar, PD-2 và PD-3). Các thanh sai số biểu thị 2 sai số chuẩn.

Fig.2 thể hiện GMC đặc hiệu typ huyết thanh với các typ huyết thanh không có trong Prevnar® ở các con khỉ đầu chó sơ sinh được gây miễn dịch bằng PCV-15. Các thanh sai số biểu thị 2 sai số chuẩn.

Fig.3: NZWR-1: thể hiện so sánh hiệu giá trung bình hình học ở các con thỏ được gây miễn dịch bằng PCV-15 không có (0xA) hoặc có APA (B1) (sau khi dùng liều 2). Các thanh sai số biểu thị 95% CI đối với số lần chênh lệch trung bình hình học (PCV-15 không có APA / PCV-15 có APA).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa giá bao gồm, chủ yếu chứa, hoặc theo cách khác, bao gồm 15 thể liên hợp polysaccharit-protein khác biệt, trong đó mỗi thể liên hợp này chứa polysaccharit vỏ khác nhau được liên hợp với protein

mang, và trong đó polysacarit vỏ được tạo ra từ các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F của *S. pneumoniae*, cùng với chất mang được dùng. Theo các phương án nhất định, protein mang là CRM₁₉₇. Chế phẩm sinh miễn dịch còn có thể chứa chất phụ trợ, như chất phụ trợ gốc nhôm, như nhôm phosphat, nhôm sulfat và nhôm hydroxyt. Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch đối với thể liên hợp polysacarit vỏ của *S. pneumoniae*, phương pháp này bao gồm bước cho người dùng lượng gây miễn dịch hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch đa giá nêu trên.

Như được minh họa trong các Ví dụ ở dưới đây, các nghiên cứu tiền lâm sàng trên các con khỉ đầu chó sơ sinh đã chứng tỏ các đáp ứng kháng thể tăng cường đối với tất cả 15 typ huyết thanh trong PCV-15 tương đương với các đáp ứng đối với 7 typ huyết thanh phổ biến trong Prevnar®. Các tác giả đã phát hiện thấy rằng vacxin chứa thể liên hợp phế cầu khuẩn 15 giá kể cả khi bổ sung thêm thể liên hợp polysacarit-protein mới chứa typ huyết thanh 22F và 33F cũng tạo ra các đáp ứng kháng thể tăng cường, điều này cho thấy việc mở rộng phạm vi bao gồm các typ huyết thanh của phế cầu khuẩn hiện chưa có mặt trong các vacxin phế cầu khuẩn đang có là khả thi.

Thuật ngữ "bao gồm" khi được sử dụng cùng với chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế chỉ việc kết hợp thêm các thành phần khác bất kỳ (là đối tượng hạn chế của cụm từ "gồm có" khi đề cập đến hỗn hợp kháng nguyên), như chất phụ trợ và tá được. Thuật ngữ "gồm có" khi được sử dụng với hỗn hợp thể liên hợp polysacarit-protein đa giá chỉ hỗn hợp gồm có 15 thể liên hợp polysacarit protein cụ thể của *S. pneumoniae* và không bao gồm thể liên hợp polysacarit protein của *S. pneumoniae* khác từ một typ huyết thanh khác nhau.

Thể liên hợp polysacarit-protein mang của *Streptococcus p pneumoniae*

Polysacarit vỏ từ *Streptococcus pneumoniae* có thể được tạo ra theo kỹ thuật 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 tạo kích cỡ đến một mức độ nhất định bằng các phương pháp đã biết (xem, ví dụ, patent châu Âu số EP497524 và EP497525) và tốt hơn nếu là bằng cách vi hóa lỏng. Các polysacarit có thể được tạo kích cỡ để làm giảm độ nhớt trong các mẫu polysacarit và/hoặc để

cải thiện khả năng lọc đối với các sản phẩm liên hợp. Theo sáng chế, polysacarit vỏ được tạo ra từ các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F của *S. pneumoniae*.

Theo một phương án, mỗi typ huyết thanh polysacarit phế cầu khuẩn được sinh trưởng trong môi trường dựa trên đậu tương. Từng polysacarit đơn lẻ sau đó được tinh chế qua các bước chuẩn bao gồm bước ly tâm, kết tủa, và siêu lọc. Xem, ví dụ, công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2008/0286838 và patent Mỹ số 5,847,112.

Protein mang tốt hơn nếu là protein không độc và không tạo phản ứng và có thể thu được với lượng và độ tinh khiết thích hợp. Protein mang có thể được liên hợp hoặc được nối với polysacarit của *S. pneumoniae* để tăng tính sinh miễn dịch của polysacarit này. Các protein mang cần phải sửa được theo các quy trình liên hợp chuẩn. Theo phương án cụ thể của sáng chế, CRM₁₉₇ được dùng làm protein mang. Theo một phương án, polysacarit vỏ đơn lẻ được liên hợp với cùng protein mang (mỗi phân tử polysacarit vỏ được liên hợp với một protein mang). Theo phương án khác nữa, các polysacarit vỏ được liên hợp với hai hoặc nhiều protein mang (mỗi phân tử polysacarit vỏ được liên hợp với một protein mang). Theo phương án này, mỗi polysacarit vỏ của cùng typ huyết thanh thường được liên hợp với cùng protein mang.

CRM₁₉₇ là một biến thể không độc (tức là, nhược độc tố) của độc tố bạch cầu. Theo một phương án, nó được phân lập từ môi trường nuôi cấy *Corynebacterium diphtheria* chủng C7 (β197) sinh trưởng trong môi trường dựa trên các axit casamino và chất chiết nấm men. Theo phương án khác, CRM₁₉₇ được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp theo các phương pháp được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,614,382. Thông thường, CRM₁₉₇ được tinh chế bằng cách kết hợp các phương pháp siêu lọc, kết tủa bằng amoni sulfat và sắc ký trao đổi ion. Theo một số phương án, CRM₁₉₇ được tạo ra trong *Pseudomonas fluorescens* sử dụng Pfenex Expression Technology™ (Pfenex Inc., San Diego, CA).

Protein mang thích hợp khác bao gồm các độc tố vi khuẩn khác đã bất hoạt như DT (nhược độc tố bạch cầu), TT (nhược độc tố uốn ván) hoặc mảnh C của TT, nhược độc tố ho gà, nhược độc tố dịch tả (ví dụ, như được nêu trong công bố đơn

quốc tế số WO 2004/083251), LT của *E. coli*, ST của *E. coli*, và ngoại độc tố A từ *Pseudomonas aeruginosa*. Các protein màng ngoài của vi khuẩn như phức hợp màng ngoài c (OMPC), porin, protein liên kết transferrin, protein bề mặt của phế cầu khuẩn (PspA; xem công bố đơn quốc tế số WO 02/091998), protein adhesin của phế cầu khuẩn (PsaA), C5a peptidaza từ liên cầu khuẩn Nhóm A hoặc Nhóm B, hoặc protein D của *Haemophilus influenzae*, pneumolysin của phế cầu khuẩn (Kuo *et al.*, 1995, Infect Immun 63; 2706-13) bao gồm ply được giải độc ở một số dạng, ví dụ dPLY-GMBS (xem công bố đơn quốc tế số WO 04/081515) hoặc dPLY-formol, PhtX, bao gồm PhtA, PhtB, PhtD, PhtE và thể dung hợp của các protein Pht, ví dụ thể dung hợp PhtDE, thể dung hợp PhtBE (xem công bố đơn quốc tế số WO 01/98334 và WO 03/54007), cũng có thể được sử dụng. Các protein khác, như albumin trứng, keyhole limpet hemocyanin (KLH) (là một loại protein lớn do một loài nhuyễn thể biển sản xuất), albumin huyết thanh bò (BSA) hoặc dẫn xuất protein được tinh chế của tuberculin (PPD), PorB (từ *N. meningitidis*), PD (protein D của *Haemophilus influenzae*; xem, ví dụ, patent châu Âu số EP 0 594 610 B), hoặc các thể tương đương chức năng miễn dịch của chúng, các peptit tổng hợp (xem patent châu Âu số EP0378881 và EP0427347), các protein sốc nhiệt (xem công bố đơn quốc tế số WO 93/17712 và WO 94/03208), các protein ho gà (xem công bố đơn quốc tế số WO 98/58668 và patent châu Âu số EP0471177), xytokin, lymphokin, yếu tố tăng trưởng hoặc các hormon (xem công bố đơn quốc tế số WO 91/01146), các protein nhân tạo bao gồm nhiều epitop tế bào T dương tính với CD4 ở người từ các kháng nguyên thu được từ nguồn 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 thu sắt (xem công bố đơn quốc tế số WO 01/72337), độc tố A hoặc B của *C. difficile* (xem công bố đơn quốc tế số WO 00/61761), và flagellin (xem Ben-Yedidia *et al.*, 1998, Immunol Lett 64:9) cũng có thể được dùng làm protein mang.

Các thể đột biến DT khác có thể được sử dụng, như CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida *et al.*, 1973, J Biol Chem 218:3838-3844); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 và CRM107 và các đột biến khác được Nicholls và Youle nêu trong tài liệu: Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Marcel Dekker Inc, 1992; loại bỏ hoặc đột biến Glu-148 thành Asp, Gln hoặc Ser và/hoặc Ala 158

thành Gly và các đột biến khác được nêu trong patent Mỹ số 4,709,017 hoặc patent Mỹ số 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 nêu trong patent Mỹ số 5,917,017 hoặc patent Mỹ số 6,455,673; hoặc mảnh được nêu trong patent Mỹ số 5,843,711.

Polysacarit đã tinh chế được hoạt hóa bằng hóa chất để tạo ra sacarit có khả năng phản ứng với protein mang. Ngay khi được hoạt hóa, từng polysacarit vô riêng lẻ sẽ được liên hợp riêng với protein mang để tạo ra thể liên hợp glyco. Thể liên hợp polysacarit này có thể được điều chế bằng kỹ thuật kết hợp đã biết.

Theo một phương án, việc hoạt hóa polysacarit bằng hóa chất và sau đó dung hợp với protein mang được thực hiện bằng các biện pháp được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,365,170, 4,673,574 và 4,902,506. Tóm lại, phương pháp hoạt hóa bằng hóa chất này bao gồm việc hoạt hóa polysacarit phé cầu khuẩn bằng cách cho phản ứng với tác nhân oxy hóa bất kỳ mà có tác dụng oxy hóa nhóm hydroxyl tận cùng thành aldehyt, như periodat (bao gồm natri periodat, kali periodat, hoặc axit periodic). Phản ứng này dẫn đến việc phân cắt oxy hóa ngẫu nhiên đối với các nhóm hydroxyl lân cận của các hydrat cacbon này kèm theo tạo thành nhóm aldehyt có tính phản ứng.

Việc kết hợp với protein mang (ví dụ, CRM₁₉₇) có thể được thực hiện bằng cách amin hóa khử thông qua việc amin hóa trực tiếp đối với nhóm lysyl của protein. Ví dụ, việc liên hợp được thực hiện bằng cách cho hỗn hợp của polysacarit đã hoạt hóa và protein mang phản ứng với tác nhân khử như natri xyanobohydrua. Các aldehyt chưa phản ứng sau đó được bảo vệ bằng cách bổ sung tác nhân khử mạnh, như natri bohydrua.

Theo phương án khác, phương pháp liên hợp nêu trên có thể dựa vào việc hoạt hóa sacarit bằng 1-xyano-4-dimetylamino pyridini tetraflororat (CDAP) để tạo ra xyanat este. Sacarit đã hoạt hóa theo cách này có thể được kết hợp trực tiếp hoặc thông qua nhóm đệm (tác nhân liên kết) với nhóm amin trên protein mang. Ví dụ, nhóm đệm có thể là xystamin hoặc xysteamin để tạo ra polysacarit được thiolat hóa mà có thể được kết hợp với chất mang thông qua liên kết thioete thu được sau phản ứng với protein mang được hoạt hóa bằng maleimit (ví dụ, bằng cách sử dụng GMBS) hoặc protein mang được haloaxetyl hóa (ví dụ, sử dụng iodoaxetimit [ví dụ,

ethyl iodoacetimid HCl] hoặc N-succinimidyl bromoacetat hoặc SIAB, hoặc SIA, hoặc SBAP). Tốt hơn là, este xyanat (tùy chọn được tạo ra sử dụng hóa học CDAP) được kết hợp với hexan diamin hoặc dihydrazit của axit adipic (ADH) và sacarit được tạo dẫn xuất amino được liên hợp với protein mang sử dụng hóa học carbodiimide (ví dụ, EDAC hoặc EDC) thông qua nhóm carboxyl trên protein mang. Các thể liên hợp này được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 93/15760, WO 95/08348 và WO 96/29094; và Chu *et al.*, 1983, *Infect. Immunity* 40:245-256.

Các kỹ thuật thích hợp khác sử dụng các carbodiimide, hydrazit, các este hoạt tính, norboran, axit p-nitrobenzoic, N-hydroxysuccinimide, S--NHS, EDC, TSTU. Nhiều hợp chất nêu trên được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 98/42721. Việc liên hợp có thể được thực hiện sử dụng tác nhân liên kết cacbonyl mà có thể được tạo ra bằng cách cho nhóm hydroxyl tự do của sacarit phản ứng với CDI (xem tài liệu: Bethell *et al.*, 1979, *J. Biol. Chem.* 254:2572-4; Hearn *et al.*, 1981, *J. Chromatogr.* 218:509-18), tiếp theo cho phản ứng với protein để tạo ra liên kết carbamat. Phản ứng này có thể bao gồm việc khử đầu tận cùng anome thành nhóm hydroxyl bậc một, tùy ý bảo vệ/loại nhóm bảo vệ của nhóm hydroxyl bậc một, cho nhóm hydroxyl bậc một phản ứng với CDI để tạo ra sản phẩm trung gian CDI carbamat và kết hợp sản phẩm trung gian CDI carbamat với nhóm amin trên protein.

Theo một phương án, trước khi bào chế thành chế phẩm, mỗi kháng nguyên là polysacarit vỏ của phế cầu khuẩn được tinh chế riêng rẽ từ *S. pneumoniae*, sẽ được hoạt hóa để tạo ra aldehyt có tính phản ứng, và sau đó, liên hợp cộng hóa trị bằng cách amin hóa khử thành protein mang CRM₁₉₇.

Sau khi để polysacarit vỏ liên hợp với protein mang, thể liên hợp polysacarit-protein sẽ được tinh chế (tăng lượng thể liên hợp polysacarit-protein) bằng một kỹ thuật hoặc kết hợp nhiều kỹ thuật khác nhau. Ví dụ về các kỹ thuật này đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ và bao gồm các hoạt động cô đặc/thẩm lọc, siêu lọc, kết tủa/rửa giải, sắc ký cột, và lọc kỹ. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 6,146,902.

Dược phẩm/chế phẩm vacxin

Sáng chế còn đề xuất các chế phẩm, bao gồm chế phẩm dược, chế phẩm

sinh miễn dịch và vaccin, bao gồm, chủ yếu bao gồm, hoặc theo cách khác, chứa 15 thể liên hợp polysacarit-protein khác nhau, trong đó các thể liên hợp này đều chứa polysacarit vỏ khác nhau được liên hợp với protein mang, và trong đó polysacarit vỏ được điều chế từ các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F của *S. pneumoniae*, cùng với chất mang và chất phụ trợ được dụng. Các thể liên hợp của phế cầu khuẩn này được tạo ra bằng các quy trình riêng biệt và được bào chế ở dạng bột rời thành chế phẩm dạng liều đơn.

Như được xác định trong bản mô tả này, "chất phụ trợ" là chất dùng để làm 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 đối với kháng nguyên là chất sinh miễn dịch yếu khi được dùng một mình, ví dụ, không tạo ra hoặc tạo ra hiệu giá kháng thể thấp hoặc không tạo ra hoặc tạo ra đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào thấp, làm tăng hiệu giá của kháng thể đối với kháng nguyên, và/hoặc hạ thấp liều cho hiệu quả của kháng nguyên để thu được đáp ứng miễn dịch ở cá thể dùng. Như vậy, các tá được thường được đưa vào để làm tăng cường đáp ứng miễn dịch và đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Các tá được thích hợp để làm tăng cường hiệu quả của chế phẩm bao gồm, nhưng không giới hạn ở:

1) các muối nhôm (phèn), như nhôm hydroxyt, nhôm phosphat, nhôm sulfat, v.v.;

2) chế phẩm nhũ tương dầu trong nước (có hoặc không có tác nhân kích thích miễn dịch đặc hiệu khác như muramyl peptit (được định nghĩa dưới đây) hoặc thành phần trong thành tế bào của vi khuẩn), như, ví dụ, (a) MF59 (Công bố đơn quốc tế số WO 90/14837), chứa Squalen 5%, Tween 80 0,5%, và Span 85 0,5% (tùy ý bao gồm MTP-PE với lượng khác nhau) được phối trộn thành các hạt siêu nhỏ (có kích thước dưới mức micron) sử dụng thiết bị vi hóa lỏng như thiết bị vi hóa lỏng Model 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, chứa Squalen 10%, Tween 80 0,4%, polyme được phong bế bằng pluronic L121 5%, và thr-MDP hoặc được vi hóa lỏng thành nhũ tương siêu nhỏ (có kích thước dưới mức micron) hoặc được trộn xoáy để tạo ra nhũ tương có cỡ hạt lớn hơn, (c) hệ thống chất phụ trợ RibiTTM (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) chứa Squalen 2%, Tween 80 0,2%, và một hoặc nhiều

thành phần cấu tạo nên thành tế bào của vi khuẩn từ nhóm bao gồm monophosphorylipit A được 3-O-deacyl hóa (MPL™) được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,912,094, trehaloza dimycolat (TDM), và khung xương tạo nên thành tế bào (CWS), tốt hơn nếu là MPL+CWS (Detox™); và (d) Montanide 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 chất phụ trợ này như ISCOM (các phức kích thích miễn dịch được tạo ra bởi hỗn hợp của cholesteol, saponin, phospholipit, và các protein lưỡng tính) và Iscomatrix® (có cấu trúc gần giống như ISCOM nhưng không có protein);

4) lipopolysaccharit vi khuẩn, chất tương tự lipit A tổng hợp như hợp chất aminoalkyl glucosamin phosphat (AGP), hoặc các dẫn xuất hoặc các chất tương tự của chúng, do Corixa cung cấp, và được mô tả trong patent Mỹ số 6,113,918; một hợp chất AGP này là 2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamino]etyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamino]-b-D-glucopyranosit, còn được gọi là 529 (trước đây được biết là RC529), mà được phối trộn dưới dạng chứa nước hoặc dưới dạng nhũ tương ổn định;

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

6) xytokin, như interleukin (ví dụ, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, v.v.), interferon (ví dụ, gama interferon), yếu tố kích thích việc tạo cụm của đại thực bào dạng hạt (GM-CSF), yếu tố kích thích tạo cụm đại thực bào (M-CSF), yếu tố hoại tử khối u (TNF), phân tử đồng kích thích B7-1 và B7-2, v.v.; và

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

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

Peptit muramyl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, N-axetyl-muramyl-L-

threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-acetyl-normuramyl-L-alanin-2-(1'-2' dipalmitoyl-sn-glyxero-3-hydroxyphosphoryloxy)-etylamin (MTP-PE), v.v..

Theo các phương án nhất định, chất phụ trợ là muối nhôm. Chất phụ trợ muối nhôm có thể là vacxin được kết tủa bằng phèn hoặc vacxin được hấp phụ trên phèn. Chất phụ trợ muối nhôm đã được biết rõ trong lĩnh vực 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). Các muối nhôm bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, nhôm oxyt hydrat hóa, alumin hydrat, alumin trihydrat (ATH), alumin hydrat, alumin trihydrat, alhydrogel, Superfos, Amphogel, nhôm (III) hydroxyt, nhôm hydroxyphosphat sulfat (chất phụ trợ nhôm phosphat (APA)), nhôm oxyt vô định hình, nhôm oxyt trihydrat hóa, hoặc trihydroxy nhôm.

APA là huyền phù chứa nước của nhôm hydroxyphosphat. APA được sản xuất bằng cách trộn nhôm clorua và natri phosphat theo tỷ lệ thể tích là 1:1 để làm kết tủa nhôm hydroxyphosphat. Sau quy trình trộn, nguyên liệu thu được được giảm kích cỡ bằng thiết bị trộn cắt tốc độ cao để thu được kích cỡ hạt kết tụ mong muốn trong khoảng từ 2 đến 8 μm . Sản phẩm này sau đó được thẩm tách dựa trên nước muối sinh lý và hơi nước đã vô trùng.

Theo các phương án nhất định, $\text{Al}(\text{OH})_3$ có trên thị trường (ví dụ Alhydrogel hoặc Superfos của Denmark/Accurate Chemical and Scientific Co., Westbury, NY) được sử dụng để hấp phụ các protein theo tỷ lệ là 50 - 200 g protein/mg nhôm hydroxyt. Theo phương án khác, việc hấp phụ protein phụ thuộc vào pI (pH đẳng điện) của protein và độ pH của môi trường. Protein có pI thấp hơn sẽ hấp phụ vào ion nhôm tích điện dương mạnh hơn so với protein có pI cao hơn. Các muối nhôm có thể tạo ra kho chứa Ag được giải phóng từ từ trong khoảng thời gian từ 2 đến 3 tuần, liên quan đến việc hoạt hóa không đặc hiệu của các đại thực bào và hoạt hóa bỏ 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 đơn giá ở dạng khối dung dịch nước pha sẵn thường được phối trộn với nhau và được pha loãng để thu được nồng độ mong muốn là 8 $\mu\text{g/mL}$

đối với tất cả các typ huyết thanh trừ loại 6B, đối với huyết thanh này, sẽ pha loãng để thu được 16 $\mu\text{g/mL}$. Ngay sau khi pha loãng, mẻ này sẽ được lọc vô trùng, và một lượng thể tích tương đương của chất phụ trợ nhôm phosphat được thêm vào theo cách vô khuẩn để thu được nồng độ nhôm cuối cùng là 250 $\mu\text{g/mL}$. Sau khi phối trộn, thêm chất phụ trợ, chế phẩm thu được sẽ được nạp vào các lọ nhỏ dùng 1 lần với liều 0,5 mL/liều.

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

"Nucleotit chứa CpG", "oligonucleotit chứa CpG", "oligonucleotit CpG," và các thuật ngữ tương tự chỉ phân tử nucleotit có chiều dài 6-50 nucleotit, chứa gốc CpG chưa được metyl hóa. Xem, ví dụ tài liệu: Wang *et al.*, 2003, Vaccine 21:4297. Theo phương án khác, các định nghĩa khác đã được chấp nhận trong lĩnh vực bất kỳ của các thuật ngữ này cũng được chấp nhận trong sáng chế. Oligonucleotit chứa CpG bao gồm oligonucleotit được cải biến bằng cách sử dụng các liên kết liên nucleosit (giữa các nucleosit) tổng hợp bất kỳ, bazơ cải biến và/hoặc đường cải biến.

Các phương pháp để sử dụng oligonucleotit CpG là đã được biết rõ trong lĩnh vực 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 tài liệu: Yasuda *et al.*, 2006, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 23:89-110.

Sử dụng/liều

Chế phẩm và dạng bào chế theo sáng chế có thể được sử dụng để bảo vệ hoặc điều trị người dễ nhiễm khuẩn phế cầu khuẩn, bằng cách dùng vacxin qua đường toàn thân hoặc niêm mạc. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch đối với thể liên hợp polysaccharit vỏ của *S. pneumoniae*, phương pháp này bao gồm việc cho người dùng lượng gây miễn dịch hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp chủng ngừa cho người chống lại việc nhiễm khuẩn phế cầu khuẩn, phương pháp này bao gồm bước cho người dùng lượng cho tác dụng gây

miễn dịch của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế.

"Lượng hữu hiệu" của chế phẩm theo sáng chế chỉ liều cần thiết để tạo ra các kháng thể mà làm giảm đáng kể khả năng xảy ra hoặc mức độ nghiêm trọng của việc nhiễm *S. pneumoniae* trong thời gian thử sau đó.

Các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng khởi phát do *S. pneumoniae* gây ra bao gồm cả nhiễm khuẩn xâm lấn (bệnh viêm màng não, bệnh viêm phổi, và nhiễm trùng huyết), và nhiễm khuẩn không xâm lấn (viêm tai giữa cấp, và bệnh viêm xoang).

Việc dùng các chế phẩm của sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều đường: tiêm bắp, trong màng bụng, trong da hoặc dưới da; hoặc thông qua việc dùng cho niêm mạc qua đường miệng/quá đồ ăn, đường hô hấp hoặc đường niệu sinh dục. Theo một phương án, dùng qua mũi được sử dụng để điều trị bệnh viêm phổi hoặc viêm tai giữa (vì việc di chuyển của phế cầu khuẩn qua mũi hầu có thể được ngăn chặn một cách hiệu quả hơn, như vậy làm giảm mức độ nhiễm khuẩn ở giai đoạn sớm nhất).

Lượng thể liên hợp trong mỗi liều vaccin được chọn là lượng mà tạo ra đáp ứng bảo vệ miễn dịch mà không gây ra tác dụng phụ đáng kể. Lượng này có thể thay đổi tùy thuộc vào typ huyết thanh phế cầu khuẩn. Thông thường, mỗi liều sẽ bao gồm từ 0,1 đến 100 µg mỗi polysaccharit, cụ thể là từ 0,1 đến 10 µg, và cụ thể hơn là từ 1 đến 5 µg. Ví dụ, mỗi liều có thể bao gồm 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, hoặc 750 ng hoặc 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.

Lượng tối ưu của các thành phần cho một vaccin cụ thể có thể được xác định chính xác bằng các nghiên cứu chuẩn bao gồm việc quan sát các đáp ứng miễn dịch thích hợp ở các đối tượng. Ví dụ, theo phương án khác, liều để chủng ngừa ở người được xác định bằng cách ngoại suy từ kết quả nghiên cứu trên động vật thành số liệu trên người. Theo phương án khác, liều này được xác định theo kinh nghiệm.

Theo một phương án, liều 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, 5mg hoặc cao hơn. Theo phương án khác nữa, liều muối phèn được nêu trên đây tính cho mỗi µg protein tái tổ hợp.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, vaccin PCV-15 là dạng bào chế lỏng vô trùng chứa polysacarit vỏ phẩy cầu khuẩn của typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F được liên hợp riêng biệt với CRM₁₉₇. Mỗi liều 0,5 mL được điều chế chứa: mỗi sacarit 2 µg, trừ 6B là 4µg; khoảng 32 µg protein mang CRM₁₉₇ (ví dụ, 32 µg ± 5 µg, ± 3 µg, ± 2 µg, hoặc ± 1 µg); 0,125mg chất phụ trợ nhôm nguyên tố (0,5mg nhôm phosphat); và natri clorua và chất đệm L-histidin. Nồng độ natri clorua vào khoảng 150 mM (ví dụ, 150 mM ± 25 mM, ± 20 mM, ± 15 mM, ± 10 mM, hoặc ± 5 mM) và khoảng 20 mM chất đệm L-histidin (ví dụ, 20 mM ± 5 mM, ± 2,5 mM, ± 2 mM, ± 1 mM, hoặc ± 0,5 mM).

Theo phương pháp bất kỳ theo sáng chế và theo một phương án, đối tượng là người. Theo các phương án nhất định, bệnh nhân là trẻ sơ sinh (dưới 1 tuổi), trẻ mới biết đi (khoảng 12 đến 24 tháng), hoặc trẻ nhỏ (khoảng 2 đến 5 tuổi). Theo các phương án khác, bệnh nhân là người già (> 65 tuổi). Chế phẩm theo sáng chế cũng thích hợp để sử dụng cho trẻ lớn hơn, trẻ vị thành niên và người lớn (ví dụ, độ tuổi từ 18 đến 45 tuổi hoặc từ 18 đến 65 tuổi).

Theo một phương án của các phương pháp theo sáng chế, chế phẩm theo sáng chế được dùng để chủng một lần. Theo phương án khác, vaccin được sử dụng hai lần, ba lần hoặc bốn lần hoặc nhiều hơn, cách nhau một khoảng thời gian thích hợp. Ví dụ, chế phẩm có thể được sử dụng vào các thời điểm 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 tháng hoặc tổ hợp bất kỳ của các thời điểm này. Chế độ gây miễn dịch có thể thực hiện theo chế độ gây miễn dịch được thiết kế cho các vaccin phẩy cầu khuẩn. Ví dụ, chế độ thông thường cho trẻ sơ sinh và trẻ mới biết đi đối với bệnh xâm lấn do *S. pneumoniae* gây ra là 2, 4, 6 và 12-15 tháng tuổi. Như vậy, theo phương án được ưu tiên, chế phẩm được dùng dưới dạng một loạt 4 liều ở thời điểm 2, 4, 6, và 12-15 tháng tuổi.

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều protein từ *S. pneumoniae*. Ví dụ về các protein từ *S. pneumoniae* thích hợp để đưa vào bao gồm các protein được nêu trong công bố đơn quốc tế số WO 02/083855 và WO 02/053761.

Các chế phẩm

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng theo một hoặc

nhiều phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, như ngoài đường tiêu hóa, qua niêm mạc, qua da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong da, trong mũi, dưới da, trong màng bụng, và được bào chế thành dạng bào chế tương ứng.

Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế được sử dụng thông qua việc tiêm trong biểu bì, tiêm bắp, dùng trong tĩnh mạch, trong động mạch, tiêm dưới da, hoặc tiêm vào trong niêm mạc trong đường hô hấp đối với các chế phẩm dạng lỏng. Các chế phẩm dạng lỏng để tiêm bao gồm dung dịch và các dạng tương tự.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng lọ chứa liều đơn, lọ nhỏ chứa nhiều liều hoặc dưới dạng xy lanh đã nạp trước chế phẩm.

Theo phương án khác, chế phẩm theo sáng chế được sử dụng qua đường miệng, và do đó, các chế phẩm này sẽ được bào chế dưới dạng thích hợp để sử dụng qua đường miệng, tức là, dưới dạng chế phẩm rắn hoặc lỏng. Chế phẩm rắn dùng qua đường miệng bao gồm viên nén, viên nang, viên thuốc tròn, dạng hạt cốm, viên thuốc nhỏ và dạng tương tự. Chế phẩm lỏng dùng qua đường miệng bao gồm dung dịch, huyền phù, thể phân tán, nhũ tương, dầu và dạng tương tự.

Chất mang được dùng cho các chế phẩm lỏng là dung dịch, huyền phù, nhũ tương hoặc dầu chứa nước hoặc không chứa nước. 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 rượu/nước, nhũ tương hoặc huyền phù, bao gồm nước muối và môi trường đệm. Ví dụ về các dầu là các dầu có nguồn gốc động vật, thực vật, hoặc dầu tổng hợp, ví dụ, dầu lạc, dầu đậu tương, dầu ôliu, dầu hoa hướng dương, dầu gan cá, dầu từ các loại hải sản khác nữa, hoặc lipit từ sữa hoặc trứng.

Dược phẩm có thể có tính đẳng trương, nhược trương hoặc ưu trương. Tuy nhiên, thường được ưu tiên là trường hợp dược phẩm để truyền hoặc tiêm chủ yếu có tính đẳng trương, khi nó được sử dụng. Do vậy, để bảo quản, dược phẩm có thể tốt hơn nếu dược phẩm này có tính đẳng trương hoặc ưu trương. Nếu bảo quản dược phẩm có tính ưu trương, dược phẩm này có thể được pha loãng để trở thành dung dịch đẳng trương trước khi sử dụng.

Tác nhân làm đẳng trương có thể là tác nhân làm đẳng trương dạng ion như

muối hoặc tác nhân đẳng trương dạng không ion như hydrat cacbon. Ví dụ về tác nhân đẳng trương dạng ion bao gồm, nhưng không giới hạn ở, NaCl, CaCl₂, KCl và MgCl₂. Ví dụ về tác nhân đẳng trương dạng không ion bao gồm, nhưng không giới hạn ở, manitol, sorbitol và glyxerol.

Cũng được ưu tiên là trường hợp ít nhất một chất phụ gia được dùng là chất đệm. Đối với một số mục đích, ví dụ, khi được phẩm được dùng để truyền hoặc tiêm, thường muốn chế phẩm sẽ bao gồm chất đệm, mà có khả năng đệm dung dịch đến độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 10, như 5 đến 9, ví dụ từ 6 đến 8.

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

Chất đệm ví dụ còn có thể được chọn từ chất đệm có thể tương hợp USP để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, cụ thể, khi chế phẩm được ở dạng để sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ chất đệm có thể được chọn từ nhóm bao gồm axit monoaxit như axit axetic, axit benzoic, axit gluconic, axit glyxeric và axit lactic; axit diacid như axit aconitic, axit adipic, axit ascorbic, axit cacbonic, axit glutamic, axit malic, axit succinic và axit tartaric, axit polyacid như axit citric và axit phosphoric; và các bazơ như amoniac, dietanolamin, glyxin, trietanolamin, và TRIS.

Môi trường dẫn thuốc dùng ngoài đường tiêu hóa (để tiêm dưới da, trong tĩnh mạch, trong động mạch, hoặc tiêm bắp) bao gồm dung dịch natri clorua, dextroza Ringer, dextroza và natri clorua, dầu Ringer được lactat hóa và dầu không bay hơi. Môi trường dẫn thuốc dùng trong tĩnh mạch bao gồm dịch lỏng và các chất bổ sung dinh dưỡng, các chất bổ sung chất điện phân như các chất dựa trên dextroza Ringer, và các chất tương tự. Các ví dụ là các chất lỏng vô trùng như nước và dầu, có hoặc không bổ sung chất hoạt động bề mặt và chất phụ trợ được dùng khác. Nhìn chung, nước, nước muối, dung dịch nước dextroza và dung dịch đường có liên quan, glycol như propylen glycol hoặc polyetylen glycol, và Polysorbat-80 là các chất mang lỏng được ưu tiên, cụ thể là cho dung dịch tiêm. Ví dụ về các dầu là các dầu có nguồn gốc động vật, thực vật hoặc tổng hợp, ví dụ, dầu lạc, dầu đậu tương, dầu ôliu, dầu hoa hướng dương, dầu gan cá, các dầu từ hải sản khác, hoặc lipid từ sữa hoặc trứng.

Các chế phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa chất hoạt động bề mặt. Các chất hoạt động bề mặt được ưu tiên bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chất hoạt động bề mặt là este polyoxyetylen sorbitan (thường được gọi là Tweens), đặc biệt là polysorbat 20 đến polysorbat 80; copolyme của etylen oxyt (EO), propylen oxyt (PO), và/hoặc butylen oxyt (BO), được bán trên thị trường dưới tên thương mại DOWFAX™, như copolyme khối EO/PO thẳng; octoxynol, mà có thể khác nhau số lượng nhóm etoxy (oxy-1,2-etandiyl) lặp lại, với octoxynol-9 (Triton X-100, hoặc t-octylphenoxypolyetoxyetanol) là được quan tâm đặc biệt; (octylphenoxy) polyetoxyetanol (IGEPAL CA-630/NP-40); phospholipit như phosphatidylcholin (lexitin); nonylphenol etoxylat, như các Tergitol™ NP; ete béo polyoxyetylen thu được từ rượu laurylic, xetylic, stearylic và oleylic (được biết là các chất hoạt động bề mặt Brij), như trietylglycol monolauryl ete (Brij 30); và este sorbitan (thường được biết dưới tên SPAN), như sorbitan trioleat (Span 85) và sorbitan monolaurat. Chất hoạt động bề mặt được ưu tiên có mặt trong nhũ tương là Tween 80 (polyoxyetylen sorbitan monooleat).

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

Lượng được ưu tiên của các chất hoạt động bề mặt (% theo khối lượng) là: este polyoxyetylen sorbitan (như Tween 80) với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1%, cụ thể khoảng 0,1%; octyl- hoặc nonylphenoxy polyoxyetanol (như Triton X-100, hoặc các chất tẩy rửa khác trong một loạt Triton) với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 0,1%, cụ thể từ 0,005 đến 0,02%; ete polyoxyetylen (như laureth 9) với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20%, tốt hơn nếu là từ 0,1 đến 10% và cụ thể từ 0,1 đến 1% hoặc khoảng 0,5%.

Theo phương án khác, dược phẩm được phân phối bằng hệ giải phóng có kiểm soát. Ví dụ, dược phẩm này có thể được sử dụng bằng cách truyền trong tĩnh mạch, qua miếng dán da, các liposom, hoặc các cách thức sử dụng khác. Theo phương án khác, các nguyên liệu polyme được sử dụng; ví dụ trong các vi cầu trong

hoặc miếng cây.

Cũng được bao gồm trong sáng chế là hợp chất được cải biến bằng cách liên kết cộng hóa trị của polyme tan trong nước như polyetylen glycol, copolyme của polyetylen glycol và polypropylen glycol, carboxymetyl xenluloza, dextran, rượu polyvinyllic, polyvinylpyrrolidon hoặc polyprolin. Các cải biến này có thể làm tăng khả năng hòa tan của hợp chất trong dung dịch nước, loại bỏ kết tụ, tăng cường độ ổn định lý học và hóa học của hợp chất, và giảm mạnh khả năng tham gia phản ứng của hợp chất. Theo phương án khác, hoạt tính sinh học *in vivo* mong muốn thu được bằng cách sử dụng các sản phẩm cộng hợp hợp chất-polyme với tần suất thấp hơn hoặc ở liều thấp hơn so với hợp chất chưa cải biến.

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

Các phương án khác nhau của sáng chế đã được mô tả ở trên dựa trên phần mô tả và các hình vẽ đi kèm theo, tuy nhiên cần được hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các phương án chính xác này, và các thay đổi và cải biến khác nhau có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tạo ra ở đây mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế như được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Các ví dụ sau dùng cho mục đích minh họa chứ không được dự định giới hạn sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất polysacarit vỏ của *S. pneumoniae*

Các phương pháp nuôi cấy phế cầu khuẩn đã được biết rõ trong lĩnh vực. Xem, ví dụ tài liệu: Chase, 1967, *Methods of Immunology and Immunochemistry* 1:52. Các phương pháp sản xuất polysacarit vỏ của phế cầu khuẩn cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, patent châu Âu số EP0497524. Các thể phân lập thuộc các phân nhóm của phế cầu khuẩn có sẵn từ ATCC.

Vi khuẩn được xác định là khuẩn cầu đôi có vỏ, không di động, gram dương, hình đầu nhọn, làm tan máu alpha trên máu-thạch. Các kiểu phụ được biệt hóa dựa trên phản ứng Quelling sử dụng kháng huyết thanh đặc hiệu. Xem, ví dụ,

patent Mỹ số 5,847,112.

Ngân hàng tế bào

Ngân hàng tế bào thể hiện từng loại typ huyết thanh của *S. pneumococcus* có mặt trong PCV-15 thu được từ bộ sưu tập chủng giống Merck (Merck Culture Collection) (Rahway, NJ) trong lọ nhỏ được làm đông lạnh.

Cấy chủng

Chủng dùng để gieo mầm đã được làm tan băng được chuyển tới thiết bị lên men mầm chứa môi trường sinh trưởng thích hợp đã được làm vô trùng trước.

Lên men mầm

Chủng nuôi cấy được sinh trưởng trong thiết bị lên men mầm có kiểm soát nhiệt độ và độ pH. Toàn bộ thể tích dịch trong thiết bị lên men mầm được chuyển tới thiết bị lên men sản phẩm chứa môi trường sinh trưởng đã được làm vô trùng trước.

Lên men sản xuất

Lên men sản xuất là giai đoạn sinh trưởng cuối cùng của tế bào trong quy trình. Nhiệt độ, độ pH và tốc độ khuấy được kiểm soát.

Bất hoạt

Quy trình lên men được ngừng thông qua việc bổ sung tác nhân làm bất hoạt. Sau khi bất hoạt, mẻ này được chuyển tới thùng bất hoạt trong đó thùng này được giữ ở nhiệt độ không chế và khuấy.

Tinh chế

Mảnh vỡ tế bào được loại bỏ bằng cách kết hợp giữa ly tâm và lọc. Mẻ này được siêu lọc và thẩm tách. Mẻ này sau đó được phân đoạn bằng dung môi để loại bỏ tạp chất và thu hồi polysacarit.

Ví dụ 2: Tạo ra thể liên hợp Polysacarit-CRM₁₉₇ của phế cầu khuẩn

Quy trình hoạt hóa

Sacarit từ các typ huyết thanh khác nhau được liên hợp riêng rẽ với protein mang CRM₁₉₇ đã tinh chế sử dụng quy trình xử lý thông thường. Trong quy trình

này, sacarit được hòa tan, được tạo kích cỡ để có khối lượng phân tử mong muốn, được hoạt hóa bằng hóa chất và được trao đổi chất đệm bằng cách siêu lọc. CRM₁₉₇ đã tinh chế sau đó được liên hợp với sacarit đã hoạt hóa và thể liên hợp thu được được tinh chế bằng cách siêu lọc trước khi lọc lần cuối bằng màng lọc 0,2 μm . Một số thông số xử lý trong mỗi bước, như độ pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian phụ thuộc typ huyết thanh như được nêu trong ví dụ này.

Bước 1: Hòa tan

Polysacarit đã tinh chế được hòa tan trong nước đến nồng độ là 2 - 3 mg/mL. Polysacarit đã hòa tan được cho qua thiết bị đồng nhất cơ học với áp suất đặt trước ở 0-1000 bar. Sau khi giảm kích cỡ, sacarit được cô đặc và thẩm tách bằng nước vô trùng trên bộ siêu lọc 10 kDa MWCO. Phần thẩm qua (dịch thẩm) bị loại bỏ và phần không thẩm qua được điều chỉnh đến độ pH bằng 4,1 bằng đệm natri axetat, nồng độ cuối cùng 50 mM. Đối với typ huyết thanh 4 và 5, sử dụng 100 mM natri axetat ở độ pH=5,0. Đối với typ huyết thanh 4, dung dịch được ủ ở nhiệt độ $50^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Ngừng thủy phân bằng cách làm nguội xuống ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 24°C .

Bước 2: Phản ứng periodat

Dương lượng phân tử natri periodat cần để hoạt hóa sacarit phẩy cầu khuẩn được xác định bằng cách sử dụng tổng hàm lượng sacarit. Kèm theo trộn kỹ, phản ứng oxy hóa được để diễn ra trong khoảng thời gian từ 3 đến 20 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 24°C đối với tất cả typ huyết thanh trừ 5, 7F, và 19F, nhiệt độ cho các typ huyết thanh này nằm trong khoảng từ 2 đến 6°C .

Bước 3: Siêu lọc

Sacarit sau khi đã oxy hóa được cô đặc và thẩm tách sử dụng kali phosphat 10 mM, độ pH=6,4 (natri axetat 10 mM, độ pH=4,3 đối với typ huyết thanh 5) trên bộ siêu lọc 10 kDa MWCO. Phần thẩm qua (dịch thẩm) bị loại bỏ và phần bị giữ lại trên bộ siêu lọc được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng từ 6,3 đến 8,4 bằng cách bổ sung chất đệm kali phosphat 3M.

Quy trình liên hợp

Bước 1: Phản ứng liên hợp

Sacarit sau khi cô đặc được trộn với protein mang CRM₁₉₇ theo tỷ lệ nạp là 0,2 - 2 với 1. Hỗn hợp sacarit-CRM₁₉₇ trộn lẫn được lọc qua bộ lọc kích cỡ 0,2 μm .

Phản ứng liên hợp được khơi mào bằng cách bổ sung dung dịch natri xyanobohydrua để thu được 1,8 - 2,0 mol natri xyanobohydrua cho mỗi mol của sacarit. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong khoảng thời gian từ 48 đến 120 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 24°C (8 - 12°C đối với typ huyết thanh 3, 5, 6A, 7F, 19A, và 19F).

Bước 2: Phản ứng bohhydrua

Ở cuối giai đoạn ủ liên hợp, hỗn hợp phản ứng được điều chỉnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4 đến 8°C, và độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 10 bằng đệm natri bicacbonat 1,2M hoặc đệm kali phosphat 3M (trừ typ huyết thanh 5). Phản ứng liên hợp được ngừng lại bằng cách bổ sung dung dịch natri bohhydrua để thu được 0,6 - 1,0 mol natri bohhydrua cho mỗi mol sacarit (bổ sung 0 mol bohhydrua đối với typ huyết thanh 5). Hỗn hợp phản ứng được ủ trong khoảng thời gian từ 45 đến 60 phút.

Bước 3: Bước siêu lọc

Hỗn hợp phản ứng được thẩm lọc trên bộ siêu lọc MWCO 100 kDa với thể tích tối thiểu là 20 thể tích đệm kali phosphat 100mM, độ pH=8,4. Phần bị giữ lại trên bộ siêu lọc 100 kDa tiếp tục được thẩm lọc trên bộ siêu lọc MWCO 300 kDa với thể tích tương đối của đệm thẩm lọc natri clorua 150 mM tối thiểu là 20 thể tích ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 24°C. Dịch thẩm được loại bỏ.

Bước 4: Lọc vô trùng

Phần bị giữ lại trên bộ siêu lọc MWCO 300 kDa sau khi thẩm lọc được lọc qua bộ lọc kích cỡ 0,2 μm và nạp vào các đồ chứa bằng thủy tinh bosilicat với thể tích thích hợp để thử mức độ giải phóng, kiểm soát nội quy trình, và bào chế (trừ typ huyết thanh 19F). Thể liên hợp từ typ huyết thanh 19F được lọc qua bộ lọc kích cỡ 0,2 μm vào thùng lưu trữ và được ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 24°C. Sau khi ủ, thể liên hợp này được thẩm lọc trên bộ siêu lọc MWCO 300 kDa với thể tích tương đối của đệm thẩm lọc natri clorua 150mM là 20 thể tích ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 24°C. Dịch thẩm được bỏ đi, và sản phẩm cô đặc

(sản phẩm không đi qua bộ siêu lọc) tiếp tục được lọc qua bộ lọc 0,2 μm và nạp vào các đồ chứa bằng thủy tinh bosilicat ở thể tích thích hợp để thử mức độ giải phóng, kiểm soát nội quy trình, và bào chế. Khối cô đặc cuối cùng được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C.

Ví dụ 3: Bào chế vacxin 15 giá từ thể liên hợp của phé cầu khuẩn

Thể tích khối cô đặc cần dùng được tính dựa trên thể tích mẻ và nồng độ sacarit trong khối này. 15 thể liên hợp được kết hợp được pha loãng tiếp đến nồng độ hấp phụ mong muốn bằng cách bổ sung natri clorua và L-histidin, độ pH=5,8, chứa đệm. Sau khi trộn đủ, hỗn hợp này được lọc vô trùng qua màng kích cỡ 0,2 μm . Khối dịch sau khi phối trộn và vô trùng này được trộn nhẹ nhàng trong và sau khi trộn nó với khối bột nhôm phosphat. Vacxin đã bào chế được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C.

Theo quy trình thay thế, hỗn hợp 15 thể liên hợp được pha loãng tiếp đến nồng độ mong muốn bằng cách bổ sung natri clorua và L-histidin, độ pH = 5,8, chứa đệm. Thêm polysorbat 80 đến nồng độ cuối cùng là 0,005%, vào hỗn hợp các thể liên hợp sau khi pha loãng được đệm nêu trên được pha loãng trước khi lọc vô trùng. Sau khi lọc vô trùng, vacxin đã bào chế này được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C.

Bảng 1 thể hiện thành phần cuối cùng ở dạng chứa chất phụ trợ và không chứa chất phụ trợ của PCV-15.

Bảng 1: Thành phần của các dạng bào chế vacxin 15 giá từ thể liên hợp của phé cầu khuẩn chứa chất phụ trợ và không chứa chất phụ trợ

Mô tả các thành phần		Dạng bào chế trong lâm sàng, đơn vị /0,5 mL liều	
		PCV-15 chứa chất phụ trợ	PCV-15 không chứa chất phụ trợ
Hoạt chất	Kháng nguyên polysacarit của phế cầu khuẩn	Tổng polysacarit 32 µg (2µg từng loại polysacarit thuộc các typ huyết thanh sau: 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F; 4µg polysacarit typ huyết thanh 6B)	Tổng polysacarit 32 µg (2µg từng loại polysacarit thuộc các typ huyết thanh sau: 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F; 4µg polysacarit typ huyết thanh 6B)
	Protein mang CRM ₁₉₇	~ 32 µg	~ 32 µg
Các thành phần khác	Nhôm (µg) ^a	125	0
	Polysorbat-80 (µg)	0	2,5
	L-histidin (mM)	20	20
	Natri clorua (mM)	150	150
	Nước để tiêm	Q.S. ^b	Q.S. ^b

^a lượng nhôm nguyên tố trong APA. ^b lượng vừa đủ đến 0,5 mL.

Ví dụ 4: Nghiên cứu tính miễn dịch

Các thử nghiệm được thiết kế để đánh giá tính miễn dịch của các dạng bào chế khác nhau của vaccin chứa thể liên hợp từ phế cầu khuẩn trên các con khỉ đầu chó sơ sinh (infant rhesus monkey - IRM) và trên mô hình động vật là thỏ trắng New Zealand (NZWR). Các thử nghiệm trên các con khỉ đầu chó sơ sinh được thiết kế gần giống với chế độ dùng được khuyến cáo đối với vaccin chứa thể liên hợp từ phế cầu khuẩn ở Mỹ, cho các trẻ sơ sinh ở 2, 4, và 6 tháng tuổi. Như vậy, các con khỉ đầu chó sơ sinh đã được gây miễn dịch ở 2-3 tháng tuổi và được sử dụng vaccin

ở khoảng cách là 2 tháng. Liều thứ 4, liều này cũng là một phần của chế độ dùng được khuyến cáo đối với trẻ em Mỹ không được sử dụng. Sử dụng các con thỏ trưởng thành (NZWR) để đánh giá các chế phẩm vacxin này. Các nghiên cứu trên NZWR được tiến hành sử dụng hai liều vacxin được dùng theo chế độ gây miễn dịch tăng cường (khoảng 2 tuần). Để đánh giá các đáp ứng miễn dịch tiền lâm sàng, liều đầy đủ dùng cho người được dùng cho các con thỏ nêu trên trong khi đó các con khỉ sơ sinh chỉ nhận một nửa liều dùng cho người. Lý do lựa chọn liều bằng nửa liều dùng cho người để dùng cho các con khỉ sơ sinh là do giới hạn về thể tích có thể dùng cho các con khỉ đầu chó sơ sinh ở một vị trí dùng trong cơ một lần.

Đánh giá đáp ứng IgG đặc hiệu typ huyết thanh

Thử nghiệm phát quang điện hóa đa thành phần đã được phát triển để sử dụng với huyết thanh của thỏ và khỉ đầu chó dựa trên thử nghiệm trên người có sử dụng công nghệ Meso Scale Discovery (MSD), một công nghệ sử dụng nhãn SULFO-TAG™ phát ra ánh sáng khi kích thích điện hóa. Xem tài liệu: Marchese *et al.*, 2009, Clin Vaccine Immunol 16:387-96. Bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa ECL chuyên dụng, dòng điện được đưa vào các điện cực gắn trên đĩa, tạo ra một loạt phản ứng do dòng điện gây ra, tạo ra tín hiệu phát quang. Cấu hình nhiều điểm được sử dụng để phát triển và công nhận hợp lệ là 10 điểm/lỗ trong dạng đĩa 96 lỗ, và mỗi lỗ được phủ 5 ng polysaccharit (Ps) phế cầu khuẩn (Pn) cho mỗi điểm. Hai dạng đĩa được sử dụng để đảm bảo rằng polysaccharit phản ứng chéo (tức là, 6A và 6B, và 19A và 19F) được kiểm tra trong các đĩa riêng biệt. Dạng đĩa 1 chứa typ huyết thanh 3, 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, và 23F trong khi dạng đĩa 2 chứa typ huyết thanh 1, 5, 6A, 7F, 19A, 22F và 33F. Mỗi lỗ còn chứa hai đốm albumin huyết thanh bò (BSA) mà được sử dụng để đánh giá tính phản ứng cơ sở của thử nghiệm (tức là, đáp ứng gắn với huyết thanh và kháng thể thứ hai được gắn nhãn khi không có mặt PnPs). Chất chuẩn dùng trong thử nghiệm (89SF-2), các đối chứng, và huyết thanh thử nghiệm được pha loãng đến nồng độ thích hợp trong nước muối đệm phosphat (PBS) chứa Tween 20 0,05%, BSA 1%, C-polysaccharit 5 µg/ml (CPs), polysaccharit typ huyết thanh 25 (PnPs25) 10 µg/ml và polysaccharit typ huyết thanh 72 (PnPs72) 10 µg/ml và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C (2 đến 8°C) hoặc ở nhiệt độ môi trường trong 45 phút. Chất thử và các chất chuẩn là các kháng thể người được sử dụng khi thử các mẫu trên khỉ sơ sinh trong khi IgG kháng thỏ được gắn nhãn SULFO-

TAGTM được dùng làm kháng thể thứ hai khi thử mẫu huyết thanh thu được từ thỏ. Các đĩa được phủ kháng nguyên từng đĩa được ủ ở nhiệt độ môi trường trong 1 giờ trên bề phẳng của thiết bị lắc cùng với tác nhân phong bế. Các đĩa này được rửa bằng PBS-T 0,05% và bổ sung 25 μ L huyết thanh thử đã hấp phụ trước và pha loãng vào từng lỗ và ủ trong 45 phút ở nhiệt độ môi trường trên bề phẳng của thiết bị lắc. Các đĩa này được rửa bằng PBS-T 0,05% và sau đó kháng thể thứ hai IgG dê kháng người được gắn nhãn MSD SULFO-TAGTM (đối với huyết thanh khi đầu chó) và kháng thể thứ hai IgG dê kháng thỏ được gắn nhãn (đối với huyết thanh thỏ) được thêm vào mỗi lỗ và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ môi trường trên bề phẳng của thiết bị lắc. Các đĩa này được rửa bằng PBS-T 0,05% và 150 μ L đệm đọc MSD Read Buffer -T 4X (cùng với chất hoạt động bề mặt) được pha loãng theo tỷ lệ 1:4 trong nước được thêm vào mỗi lỗ. Các đĩa này được đọc bằng cách sử dụng thiết bị MSD Sector Imager Model No.2400 hoặc 6000. Đối với các nghiên cứu trên thỏ, kết quả được thể hiện dưới dạng hiệu giá trung bình hình học (các GMT) hoặc tỷ lệ của các GMT. Đối với các nghiên cứu trên khi đầu chó sơ sinh, kết quả được thể hiện dưới dạng nồng độ trung bình hình học được đọc từ đường cong chuẩn sử dụng nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh đã được gán cho chất chuẩn là kháng thể ở người (89 SF-2).

Đánh giá các đáp ứng chức năng (Thực bào opsonin)

Các mẫu thu được từ nghiên cứu trên khi đầu chó sơ sinh 2 được kiểm tra trong thử nghiệm 4-plexed MOPA (MOPA-4). Xem tài liệu: Burton *et al.*, 2006, Clin Vaccine Immunol 13:1004-9. Thử nghiệm này sử dụng các chủng vi khuẩn được chọn để kháng với một trong số 4 chất kháng sinh sao cho phần thứ nhất của thử nghiệm (opsonin hóa và hấp thu vào các tế bào HL-60 đã biệt hóa) có thể được tiến hành cùng lúc với tối đa 4 typ huyết thanh. Việc đọc kết quả thể hiện khả năng diệt vi khuẩn được thực hiện song song khi có mặt của từng loại chất kháng sinh trong số 4 chất kháng sinh bị các chủng tương ứng kháng lại để xác định độ chuẩn (nồng độ) cho tác dụng diệt vi khuẩn cho từng typ huyết thanh cụ thể. Các kết quả được thể hiện dưới dạng nghịch đảo của độ pha loãng mà tại đó quan sát tỷ lệ vi khuẩn bị diệt là 50% (sau khi nội suy).

Phương pháp thống kê cho các nghiên cứu tiền lâm sàng

Cả hai mô hình động vật nêu trên đều có những hạn chế liên quan đến kích cỡ mẫu. Thông thường, sử dụng 8 con khỉ hoặc 8 con thỏ sơ sinh cho mỗi nhánh nghiên cứu. Với 8 động vật cho mỗi nhánh, mức chênh lệch điển hình của giá trị hiệu giá trung bình hình học giữa các nhánh điều trị là 2,5 lần được xem là ngưỡng đáp ứng có nghĩa. Sự chênh lệch 2,5 lần được xác định dựa trên giả định là đối với mỗi typ huyết thanh, độ lệch chuẩn của các hiệu giá đã chuyển đổi log tự nhiên trong nhánh điều trị là $\ln(2)$. Cho $\bar{Y}_i$ là trung bình của các hiệu giá được biến đổi $\ln$ ở nhánh điều trị thứ i , n_i là số con vật trong nhánh điều trị thứ i , σ_i^2 là phương sai đã biết của các hiệu giá đã chuyển đổi $\ln$ trong số các con vật trong nhánh điều trị thứ i , và đặt $n_i = 8$ và $\sigma_i^2 = (\ln(2))^2$ đối với tất cả i , thì thu được giá trị bằng 2,5 bằng cách giải công thức $e^{\bar{Y}_j - \bar{Y}_k}$

trong đó $\frac{\bar{Y}_j - \bar{Y}_k}{\sqrt{\frac{\sigma_j^2}{n_j} + \frac{\sigma_k^2}{n_k}}} = Z_{0,995}$, và $Z_{0,995} = 2,576$ là giá trị nghịch đảo của phân bố tích lũy

chuẩn tắc, với xác suất là 0,995 (tức là, $z_{0,995} = 2,576$). Lưu ý là giá trị theo tính toán bằng 2,44 được làm tròn thành 2,5 vì 2,5 cũng cho giá trị nghịch đảo thông thường bằng 0,4.

Đáp ứng IgG đặc hiệu typ huyết thanh ở các con khỉ đầu chó sơ sinh (các IRM) đối với PCV-15

Tiến hành nghiên cứu tính sinh miễn dịch quy mô nhỏ (IRM-1) để xác định xem các con khỉ đầu chó sơ sinh (các IRM) có phải là mô hình tốt để đánh giá các vaccin chứa thể liên hợp Polysacarit Pn-CRM₁₉₇. Mục đích ban đầu của thử nghiệm là xác định các IRM (giống như trẻ sơ sinh) không đáp ứng với polysacarit Pn tự do nhưng đáp ứng tốt đối với các vaccin chứa thể liên hợp. Các nhóm gồm 5 IRM được tiêm bắt đầu vào thời điểm 2-3 tháng tuổi bằng polysacarit Pn, Prevnar® hoặc PCV-15. Ba liều vaccin này được sử dụng trong cơ (IM) ở khoảng 2 tháng, và đáp ứng IgG đặc hiệu typ huyết thanh được xác định trước liều thứ nhất và ở 1 tháng sau liều 2 và ở 1 tháng sau liều 3 sử dụng thử nghiệm kỹ thuật phát quang điện hóa (ECL) nhiều dãy (các số liệu không được thể hiện).

Các kết quả đã chỉ ra rằng các IRM đáp ứng kém, thậm chí không đáp ứng chút nào, với polysacarit Pn tự do nhưng lại đáp ứng rất tốt với các vaccin chứa thể

liên hợp. Các kết quả này cũng chỉ ra rằng việc tạo ra đáp ứng IgG với polysacarit Pn ở các con khỉ đầu chó sơ sinh phụ thuộc vào sự liên hợp của các polysacarit với protein mang và do vậy, các đáp ứng này là đáp ứng phụ thuộc tế bào T cổ điển. Như vậy, mô hình IRM được xác định là thích hợp để đánh giá các dạng bào chế của PCV-15.

Nghiên cứu thứ hai (IRM-2) được tiến hành để đánh giá dạng bào chế của PCV-15 sử dụng quy trình liên hợp khối để giảm thiểu lượng polysacarit tự do (không liên hợp) và CRM₁₉₇ không liên hợp. Fig.1 thể hiện các đáp ứng IgG sau liều 2 (PD-2) và sau liều 3 (PD-3) với PCV-15 so với Prevnar® đối với 7 typ huyết thanh có mặt trong Prevnar® (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F). Các đáp ứng PD-2 với PCV-15 tương đương hoặc thấp hơn một chút so với các đáp ứng tương ứng với Prevnar® trong khi PD-3 đáp ứng với PCV-15 ở chừng mực nào đó cao hơn đáp ứng được tạo ra bởi Prevnar® đối với gần như tất cả các typ huyết thanh.

Các đáp ứng IRM với typ huyết thanh không có trong Prevnar nhưng có trong PCV-15 được thể hiện trên Fig.2. Các đáp ứng PD-2 với các typ huyết thanh không có trong Prevnar nhưng có trong PCV-15 tất cả đều ở nồng độ IgG cao hơn ít nhất 10 lần nồng độ IgG cơ sở (trước khi chủng vaccin), và hiệu giá tiếp tục tăng lên ở PD-3.

Các kết quả nêu trên cho thấy rằng các đáp ứng kháng thể đối với PCV-15 và Prevnar® tương đương nhau đối với 7 typ huyết thanh phổ biến và các đáp ứng sau khi chủng vaccin đối với PCV-15 cao hơn > 10 lần so với đáp ứng cơ sở đối với 8 typ huyết thanh được bổ sung.

Đáp ứng miễn dịch chức năng (Thực bào opsonin) của các IRM đối với PCV-15

Để xác định xem liệu PCV-15 có tạo ra các đáp ứng kháng thể chức năng ở các con khỉ sơ sinh hay không, thử nghiệm diệt thực bào opsonin (OPA) được tiến hành trên huyết thanh thu được từ IRM-2. Trước khi chủng ngừa, đáp ứng PD-2, và PD-3 với PCV-15 và Prevnar® được thể hiện trong Bảng 2. Kết quả được thể hiện dưới dạng các GMT từ các mẫu huyết thanh thu được từ 7-8 con khỉ tại mỗi thời điểm được xét nghiệm với hai bản sao. % đối tượng đáp ứng (tức là, đối tượng có hiệu giá OPA $\geq$ 8) ở thời điểm PD-3 cũng được nêu. PCV-15 tạo ra GMT cao vào thời điểm PD-2 đối với tất cả typ huyết thanh trừ các typ 1 và 33F. Sau 3 liều và

tượng là khi.

Bảng 2: GMT OPA đặc hiệu typ huyết thanh ở các con khi đầu chó sơ sinh sau khi chủng bằng PCV-15 hoặc Prevnar®

(hiệu giá trung bình hình học trước khi chủng ngừa, vào thời điểm PD-2, và thời điểm PD-3 và % đối tượng đáp ứng với hiệu giá ≥ 8 ở thời điểm PD-3)

Typ huyết thanh	Prevnar				PCV-15			
	Trước khi chủng ngừa	PD-2	PD-3	Số đối tượng đáp ứng ở thời điểm PD-3 (hiệu giá ≥ 8)	Trước khi chủng ngừa	PD-2	PD-3	Số đối tượng đáp ứng ở thời điểm PD-3 (hiệu giá ≥ 8)
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	65	340	100%
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5	1442	1548	100%
4	4	11459	5004	100%	4	5280	3453	100%
5	4	4	4	0%	4	1879	1719	100%
6A	4	21	113	57%	4	1188	7807	100%
6B	8	8294	6043	100%	4	2477	9601	100%
6C	4	11	16	29%	4	1038	5134	100%
7F	4	4	71	43%	4	7541	10092	100%
9V	4	1779	748	100%	4	625	1297	100%
14	8	12395	7782	100%	4	11366	9891	100%
18C	4	5571	1718	100%	4	1934	1701	100%
19A	4	15	4	0%	4	2210	1895	100%
19F	4	1365	432	100%	4	2555	4021	100%
22F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	2489	7298	100%
23F	4	1789	2126	100%	4	3093	2465	100%
33F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	14	11548	100%

Lưu ý: Các typ huyết thanh có mặt trong Prevnar được bôi đậm. Các kết quả cho typ huyết thanh 6C được thể hiện bằng các chữ in nghiêng vì typ huyết thanh này không có mặt trong PCV-15.
n.d. không xác định

Đánh giá các dạng bào chế của PCV-15 trên các con thỏ trắng New Zealand

Các dạng bào chế của PCV-15 được đánh giá trong 4 nghiên cứu trên các con thỏ trắng New Zealand trưởng thành (các NZWR) sử dụng chế độ gây miễn dịch ức chế trong đó các con thỏ được dùng liều vacxin đầy đủ dùng cho người vào ngày 0 và ngày 14, và huyết thanh được thu gom vào ngày 0, 14 và 28 để phân tích. Tất cả các nghiên cứu được so sánh với Prevnar®, và như được tổng hợp trong Bảng 3 (Thử nghiệm NZWR 1-4).

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3 là các đáp ứng sau liều 2 của thỏ trắng New Zealand được biểu thị dưới dạng tỷ lệ của đáp ứng IgG trung bình hình

học đối với Merck PCV-15 so với Prevnar® cho các typ huyết thanh có mặt trong cả hai vacxin này.

Bảng 3

Tỷ lệ đáp ứng IgG sau liều 2 (PCV-15: Prevnar™) của chế phẩm Lead PCV-15 được thử nghiệm trong NZWR

Typ huyết thanh	NZWR-1	NZWR-2	NZWR-3	NZWR-4
4	0,70	0,59	0,63	1,06
6B	1,35	0,49	1,53	0,45
9V	2,07	1,79	1,70	1,31
14	2,37	0,58	2,32	2,55
18C	0,87	0,6	0,52	0,27
19F	0,66	0,76	2,70	1,25
23F	0,36	0,30	1,22	0,41

Đáp ứng IgG đặc hiệu typ huyết thanh thường vào khoảng 2,5 lần đáp ứng tương ứng với Prevnar®. Ngoại trừ typ huyết thanh (23F), đáp ứng này thấp hơn > 2,5 lần so với đáp ứng đối với Prevnar® trong 2 trong số 4 thử nghiệm. Mức kháng thể tăng (tính bằng lần) đối với các typ huyết thanh không có mặt trong Prevnar® từ Ngày 0 đến Ngày 28 (sau liều 2, PD-2) được tổng hợp trong Bảng 4.

Bảng 4

Số lần tăng (sau liều 2 : trước liều 1) đáp ứng IgG đối với các typ huyết thanh không có mặt trong Prevnar™ nhưng có mặt trong chế phẩm Lead PCV-15 được thử nghiệm trên NZWR

Typ huyết thanh	NZWR-1	NZWR-2	NZWR-3	NZWR-4
1	14,9	30,5	55,1	59,9
3	33,6	16,2	61,5	28,5
5	12,8	70,2	112,0	134,0
6A	21,3	77,8	143,0	123,0
7F	42,0	83,8	194,0	108,0
19A	40,5	79,1	450,0	314,0
22F	45,7	87,8	243,0	135,0
33F	21,7	47,9	98,8	69,4

Ảnh hưởng của liều vacxin chứa thể liên hợp polysacarit đối với tính sinh miễn dịch ở NZWR

Tính sinh miễn dịch khi tăng liều (liều gấp đôi, 2 lần) của thể liên hợp polysacarit cũng được đánh giá đối với tất cả typ huyết thanh có mặt trong PCV-15 so với liều được dự định dùng cho người (1x) của cùng vacxin này. Đối với chế phẩm chứa lượng thể liên hợp polysacarit cao gấp hai lần (2x), nồng độ APA tăng lên 1,5 lần để đảm bảo rằng phần lớn các thể liên hợp sẽ liên kết với chất phụ trợ nhôm. Như được thể hiện trên Bảng 5, không thu được nhiều lợi ích khi tăng lượng thể liên hợp của polysacarit trong vacxin. Mức chênh lệch giữa tất cả các typ huyết thanh vào khoảng 2 lần, và tỷ lệ trung bình hình học (1x PCV-15/2X PCV-15 +1,5X APA) là 1,1 lần.

Bảng 5

Hiệu giá IgG trung bình hình học sau liều 2 (khoảng tin cậy 95%) với Prevnar®, liều 1x PCV-15* dùng cho người hoặc liều 2x PCV-15[†] dùng người trên NZWR

Typ huyết thanh	Nhánh điều trị			Mức chênh lệch (lần)
	Prevnar™ (n=8)	1x PCV-15 (n=8)	2x PCV-15 (n=8)	Tỷ lệ giữa 2x PCV-15/1x PCV-15
4	736,400 (483200, 1122400)	436,000 (199700, 951700)	472,100 (246800, 902900)	1,1
6B	363,600 (205000, 644800)	176,500 (72800, 427800)	196,900 (85900, 451400)	1,1
9V	298,200 (173800, 511700)	534,700 (362800, 788100)	580,600 (366300, 920200)	1,1
14	345,200 (200200, 595000)	198,900 (94500, 418700)	273,600 (229500, 326100)	1,4
18C	954,500 (815700, 1116800)	573,000 (396900, 827400)	455,900 (245100, 848000)	0,8
19F	720,100 (475700, 1090200)	548,000 (367700, 816800)	544,300 (269000, 1101400)	1,0
23F	816,300 (565100, 1179100)	246,200 (117200, 517100)	188,500 (78100, 454800)	0,8
1	5,300 (3100, 9200)	91,500 (62600, 133600)	72,200 (46700, 111600)	0,8
3	12,000 (8600, 16800)	32,300 (19600, 53000)	23,600 (14100, 39400)	0,7
5	5,700 (4100, 7900)	245,600 (114200, 528200)	224,600 (136700, 369100)	0,9
6A	525,900 (275000, 1005600)	186,700 (71300, 488600)	251,800 (102300, 620100)	1,3
7F	4,600 (4000, 5200)	326,900 (238000, 449000)	212,200 (134200, 335500)	0,6
19A	432,800 (237800, 787800)	260,900 (145500, 468000)	276,100 (153200, 497600)	1,1
22F	6,000 (4400, 8100)	359,800 (239000, 541700)	345,300 (221200, 539000)	1,0
33F	6,600 (4700, 9300)	177,400 (118300, 266200)	138,500 (68300, 280900)	0,8

**Được phối trộn với 1x chất phụ trợ nhôm (APA)

[†] Được phối trộn với 1,5x APA

Ảnh hưởng của chất phụ trợ nhôm đến tính sinh miễn dịch của PCV-15 ở các NZWR

Ảnh hưởng của chất phụ trợ nhôm (APA) đến các đáp ứng kháng thể được đánh giá trong một nghiên cứu trên thỏ. PCV-15 được bào chế với lượng APA được dự định dùng cho người (PCV-15 1x APA), với lượng APA gấp đôi lượng được dự định dùng cho người (PCV-15 2x APA), và không có chất phụ trợ nhôm bất kỳ (PCV-15 0x APA), được thử nghiệm. Nhóm được nhận Prevnar® cũng được bao gồm trong nghiên cứu này.

Kết quả ở thời điểm PD-2 đã chỉ ra rằng việc tăng gấp hai lần lượng APA được dùng ít tác động đến đáp ứng IgG đặc hiệu typ huyết thanh đối với PCV-15. Mức chênh lệch hiệu giá (1x APA/2x APA) nằm trong khoảng từ 0,6 lần (typ huyết thanh 6B) đến 2,3 lần (typ huyết thanh 22F) và tỷ lệ trung bình hình học giữa 15 typ huyết thanh bằng 1,1 lần. Khi không có mặt chất phụ trợ nhôm, hiệu giá của kháng thể dường như thấp hơn đối với nhiều typ huyết thanh so với PCV-15 sử dụng 1x APA. Mức chênh lệch hiệu giá (1x/0x) nằm trong khoảng từ 0,5 lần (typ huyết thanh 5) đến 2,9 lần (typ huyết thanh 23F) và tỷ lệ trung bình hình học giữa 15 typ huyết thanh bằng 1,4 lần. Tóm lại, không thấy lợi ích xác thực nào khi tăng gấp đôi lượng chất phụ trợ nhôm và dường như việc loại bỏ chất phụ trợ (Bảng 6) trong mô hình động vật này lại là một nhược điểm.

Kết quả tại thời điểm PD-2 đã chỉ ra rằng hiệu giá kháng thể giảm đối với nhiều typ huyết thanh trong nhánh không sử dụng chất phụ trợ nhôm phosphat (APA) khi so sánh với PCV-15 chứa APA (Fig.3), điều này cho thấy cần thiết phải đưa chất phụ trợ nhôm vào để tạo ra tính sinh miễn dịch tối ưu đối với PCV-15 ở các con thỏ. Ngoài ra, không phát hiện thấy lợi ích bất kỳ khi tăng gấp đôi lượng APA được đưa vào trong vacxin (các số liệu không được nêu).

Bảng 6

Hiệu giá IgG trung bình hình học sau liều 2 (khoảng tin cậy 95%) của PCV-15 được
bào chế bằng chất phụ trợ nhôm (APA) 1x, 2x hoặc 0x ở NZWR

Typ huyết thanh	Nhánh điều trị				Số lần chênh ệch so với PCV- 15 (1x APA)	
	Prevnar™ (n=8)	PCV-15 1x APA (n=8)	PCV-15 2x APA (n=8)	PCV-15 0x APA (n=6)	1x/2x APA	1x/0x APA
4	380,700 (226100, 641000)	268,400 (205100, 351200)	196,200 (84000, 458800)	404,600 (105500, 1550700)	1,4	0,7
6B	105,900 (59800, 187400)	143,300 (90700, 226300)	236,200 (102000, 547100)	93,800 (46300, 189700)	0,6	1,5
9V	271,600 (177400, 415700)	562,000 (382700, 825400)	595,600 (390200, 908900)	569,200 (239900, 1350500)	0,9	1,0
14	142,500 (75200, 269700)	337,600 (174000, 654900)	453,000 (237400, 864400)	167,600 (65100, 431700)	0,7	2,0
18C	323,000 (250400, 416500)	282,200 (210400, 378500)	248,700 (193900, 319000)	175,200 (91800, 334000)	1,1	1,6
19F	302,500 (232700, 393200)	199,800 (132200, 302100)	243,400 (87600, 676600)	127,700 (35100, 463700)	0,8	1,6
23F	328,200 (178200, 604300)	117,200 (60300, 227700)	77,600 (31300, 192300)	40,200 (10100, 160900)	1,5	2,9
1	5,600 (4400, 7200)	91,700 (46800, 179800)	67,800 (38900, 118100)	53,300 (14800, 191600)	1,4	1,7
3	6,300 (4800, 8100)	156,100 (104800, 232500)	155,700 (75300, 322200)	104,000 (45000, 240000)	1,0	1,5
5	4,800 (4000, 5700)	81,700 (50800, 131300)	60,700 (29100, 126400)	176,100 (72100, 430300)	1,3	0,5
6A	84,500 (50300, 141900)	163,600 (114000, 234900)	226,800 (92500, 556200)	99,300 (48800, 202000)	0,7	1,6
7F	5,200 (3300, 8400)	216,800 (141500, 332000)	282,100 (158200, 503200)	212,200 (64200, 701900)	0,8	1,0
19A	95,100 (54300, 166700)	238,300 (161000, 352700)	207,400 (69800, 615900)	125,700 (34000, 465100)	1,1	1,9
22F	6,500 (4900, 8500)	348,900 (267200, 455500)	149,400 (90100, 247600)	336,800 (184200, 615700)	2,3	1,0
33F	7,100 (5000, 10100)	235,600 (106500, 521300)	163,600 (92700, 288800)	222,000 (125100, 393800)	1,4	1,1

Thảo luận và kết luận

Các số liệu tiền lâm sàng nêu trên chứng tỏ rằng chế phẩm PCV-15 (được bào chế sử dụng APA) có tính sinh miễn dịch cao ở hai loài (khỉ đầu chó và thỏ sơ sinh). Đáp ứng đặc hiệu typ huyết thanh đối với PCV-15 tương đương với các đáp ứng do Prevnar® tạo ra đối với 7 typ huyết thanh phổ biến trong các vaccin. Đối với 8 typ huyết thanh mới có mặt trong PCV-15, đáp ứng mạnh thu được ở cả khỉ đầu chó sơ sinh lẫn thỏ, với mức tăng ≥ 10 lần trong đáp ứng IgG đối với tất cả các typ huyết thanh sau khi dùng vaccin liều 2 ở cả hai loài. Các thử nghiệm nằm trong khoảng liều giới hạn cho thấy rằng việc tăng gấp đôi lượng thể liên hợp polysaccharit được dùng không làm tăng đáp ứng kháng thể. Tương tự, việc tăng gấp đôi lượng chất phụ trợ nhôm được dùng không làm tăng đáng kể profin sinh miễn dịch của PCV-15. Tuy nhiên, việc loại bỏ chất phụ trợ lại làm cho mức đáp ứng thấp hơn đối với một số typ huyết thanh, điều này cho thấy tính cần thiết của việc sử dụng chất phụ trợ cho người. Các đáp ứng kháng thể chức năng (OPA) đều được PCV-15 tạo ra đối với tất cả 15 typ huyết thanh trong vaccin cũng như đối với typ huyết thanh 6C, mà không phải là một thành phần của PCV -15.

YÊU CẦU BẢO HỘ**1. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa:**

(1) hỗn hợp các thể liên hợp polysacarit-protein đa giá có các polysacarit vỏ từ các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F của *Streptococcus pneumoniae* được liên hợp với CRM₁₉₇ và không có thể liên hợp polysacarit-protein của *S.pneumonia* khác từ typ huyết thanh khác; và

(2) chất mang được dụng.

2. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa chất phụ trợ.**3. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 2, trong đó chất phụ trợ này là chất phụ trợ gốc nhôm.****4. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 3, trong đó chất phụ trợ này được chọn từ nhóm bao gồm nhôm phosphat, nhôm sulfat và nhôm hydroxyt.****5. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 4, trong đó chất phụ trợ này là nhôm phosphat.**

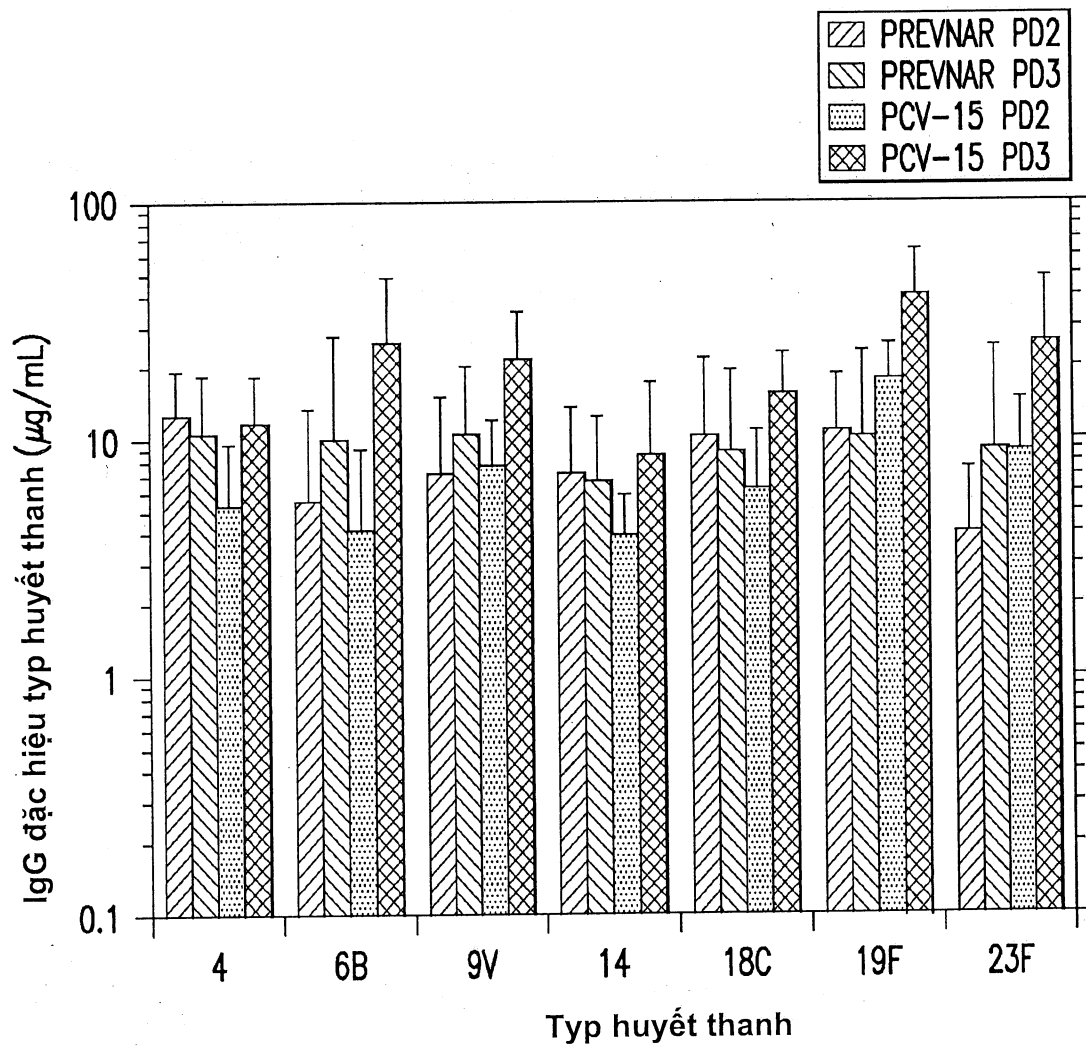


FIG.1

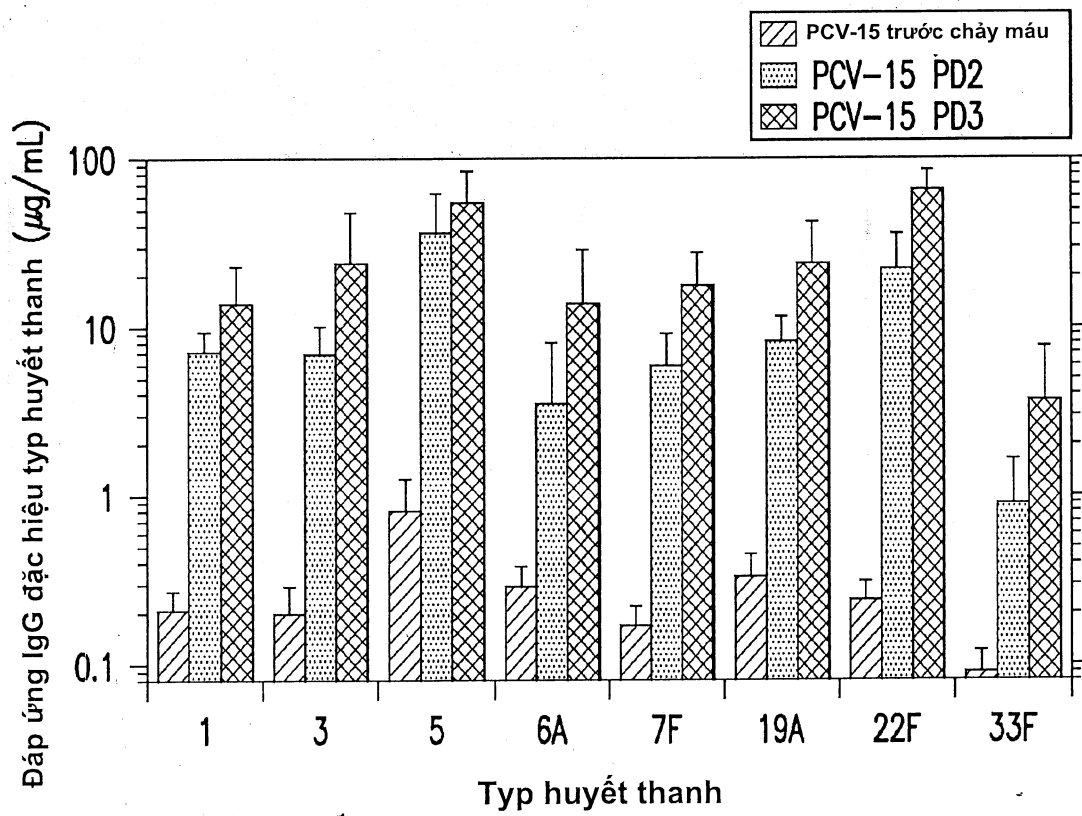


FIG.2

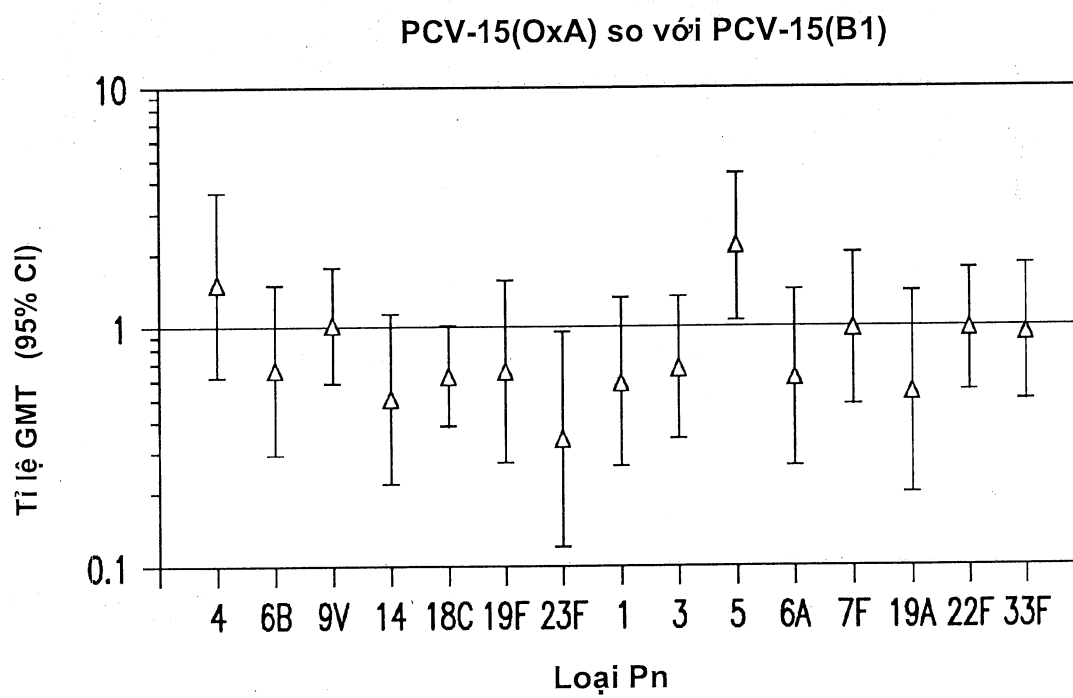


FIG.3