الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia

براءة اختراع

إن الرئيس التنفيذي للهيئة السعودية للملكية الفكرية و بموجب أحكام نظام براءات الإختراع و التصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة و الأصناف النباتية و النماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/27 وتاريخ 1425/05/29هـ و المعدل بقرار مجلس الوزراء رقم 536 و تاريخ 1439/10/19هـ ، و لائحته التنفيذية.
يقرر منح :

سيروم انستيتيوت أف إنديا برايفت إل تي دي.
SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LTD.

براءة اختراع رقم : SA 12743

بتاريخ : 1444/09/01 هـ
الموافق : 2023/03/23 م

عن الإختراع المسمى :

طريقة لتحسين امتزاز مترافقات عديد السكاريد- بروتين والحصول بها على تركيبة لقاح عديد التكافؤ

Methods for improving the adsorption of polysaccharide-protein conjugates and multivalent vaccine formulation obtained thereof

وفق ما هو موضح في وصف الاختراع المرفق، ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق النظامية في المملكة العربية السعودية خلال فترة سريان الحماية.

الرئيس التنفيذي

د. عبدالعزيز بن محمد السويلم

الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

[19] الهيئة السعودية للملكية الفكرية
[11] رقم البراءة: SA 12743 B1

[12] براءة اختراع

[45] تاريخ المنح: 1444/09/01 هـ
الموافق: 2023/03/23 م

[21] رقم الطلب: 517390495
[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: 1439/03/22 هـ
الموافق: 2017/12/10 م
[30] بيانات الأسبقية:
IN 2185/MUM/2015 2015/06/08 م

[72] اسم المخترع: راجيف مهالاساكانت دهيري ، إسوابان كومار جانا ، هيتيش كومار مالفيا ، أشا دينيش ماليا ، سامبهاجي شنكر بيسال ، مانيش ماهيش كومار جوتام ، شيتان فيلاس جوشي ، فينكاتا فامسي كريشنا ماليباتي ، براشانت شيفاجي جادهاف ، سونيل ماهور
[73] مالك البراءة: سيروم انستيتيوت أف إنديا برايفت إل تي دي.
عنوانه: 2/212 ، متفرع من طريق سولي بوناوالا ، هادابسار ،الهند
جنسيته: هندية
[74] الوكيل: مكتب حمود بن ظافر الكلثمي الشهري للمحاماة

[86] رقم الطلب الدولي: PCT/IB2016/053265
تاريخ إيداع الطلب الدولي: 2016/06/03 م
[87] رقم النشر الدولي: WO/2016/199003
تاريخ النشر الدولي: 2016/12/15 م
[51] التصنيف الدولي(IPC8):
C07K 014/315, A61K 39/000

[56] المراجع:
WO 2007071786, US 2013273098
US 2010209450, US 2014255446

SHAFER D E ET AL, "Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridiniu m tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, (20000101), vol. 18, no. 13, doi:10.1016/S0264-410X(99)00370-9, ISSN 0264-410X, pages 1273 - 1281, XP002330499 [X] 1,2,6-8 * paragraphs [02.4] , [3.5]; table 2 * [Y] 3-5,9-19

CHILUKURI SRINIVAS REDDY ET AL, "Process development and immunogenicity studies on a serogroup 'X' Meningococcal polysaccharide conjugate", BIOLOGICALS, ACADEMIC PRESS LTD., LONDON, GB, (20140107), vol. 42, no. 3, doi:10.1016/J.BIOLOGICALS.2013.12.001, ISSN 1045-1056, pages 160 - 168, XP029026370 [Y] 1-19 * page 161 - page 162

GALLETTI C ET AL, "Spectral and wavelet analysis of the flow pattern transition with impeller clearance variations in a stirred vessel", CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, OXFORD, GB, (20030901), vol. 58, no. 17, doi:10.1016/S0009-2509(03)00230-6, ISSN 0009-2509, pages 3859 - 3875, XP004448546

LEES A ET AL, "Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, (19960201), vol. 14, no. 3, doi:10.1016/0264-410X(95)00195-7, ISSN 0264-410X, pages 190 - 198, XP004057339

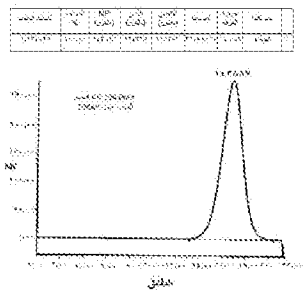
الفاحص: هند مصلح المطيري

[54] اسم الاختراع: طريقة لتحسين امتزاز مترافقات عديد السكاريد- بروتين والحصول بها على تركيبة لقاح عديد التكافؤ

Methods for improving the adsorption of polysaccharide-protein conjugates and multivalent vaccine formulation obtained thereof

[57] الملخص: ينص الاختراع الحالي على طرق لتحضير تركيبات لقاح مرافق بروتين المكورة الرئوية متعددة السكاريد مستقرة stable multivalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine formulations. تُظهر التركيبات المستقرة سريعة التحضير نسبة امتزاز adsorption percent لكل مترافق conjugate حيث يمكن منع التراكم باستخدام 1) امتزاز فردي أو منفصل للمترافقات التي تظهر بخلاف ذلك نسبة امتزاز أقل نسبيًا بالامتزاز المشترك؛ 2) نظام منظم هيستيدين histidine buffer system-حمض السكسينك Succinic acid مع وجود تغير في الرقم الهيدروجيني pH من رقم هيدروجيني pH محايد إلى رقم هيدروجيني حمضي acidic pH؛ 3) وجود نسبة من عديد السكاريد polysaccharide إلى البروتين تتراوح من 0.5 إلى حوالي 1.4؛ 4) استخدام دافع توربيني turbine impeller من نوع Rushton مزود بستة انصال في أوعية التحضير. الشكل (1)

عدد عناصر الحماية (8)، عدد الأشكال (6)



طريقة لتحسين امتزاز مترافقات عديد السكاريد- بروتين والحصول بها على تركيبة لقاح عديد التكافؤ

Methods for improving the adsorption of polysaccharide-protein conjugates and multivalent vaccine formulation obtained thereof

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

تعد المكورة الرئوية pneumococcal أحد الأسباب الرئيسية التي تؤدي إلى الإصابة بالالتهاب الرئوي البكتيري bacterial pneumonia والتهاب السحايا meningitis والإنتان sepsis لدى الأطفال. تتراوح التقديرات الأخيرة لحالات الوفيات بين الأطفال من جراء المكورة الرئوية pneumococcalمن 0.7 إلى 1.0 مليون حالة سنويًا على مستوى العالم. في 2000، تقدر حالات الإصابة بمرض المكورة الرئوية pneumococcal الشديد بحوالي 145 حالة (بنطاق غير تأكيدي يتراوح من 111 إلى 180 مليون) حالة. أدى مرض المكورة الرئوية pneumococcal إلى وفاة حوالي 0.826 مليون حالة (من 0.58 إلى 0926 مليون) في الأطفال الذين تتراوح أعمارهم من 1 إلى 59 شهرًا حيث كان منهم 0.091 مليون (من 0.063 إلى 0.0 مليون) موجب بفيروس نقص المناعة المكتسبة و0.735 مليون (من 0.51 إلى 0.82 مليون) سالب بفيروس نقص المناعة المكتسبة.

ثبتت قيمة لقاحات عديد السكاريد للمكورة الرئوية multivalent pneumococcal polysaccharide vaccines المصرح بها على مدار عدة سنوات في الوقاية من مرض المكورة الرئوية pneumococcalلدى البالغين، وخاصة كبار السن والأشخاص المعرضين لدرجة عالية من الخطر. بينما يستجيب الرضع والأطفال الصغار استجابة ضعيفة لعديدات سكاريد المكورة الرئوية pneumococcal غير المقرونة. تم ترخيص لقاح مترافق المكورة الرئوية، Prevnar®، الذي يحتوي على الأنماط المصلية السبعة الأكثر تكرارًا (4، 6B، 9V، 14، 18C، 19Fو23F) التي تؤدي إلى الإصابة بمرض المكورة الرئوية pneumococcal

الاجتياحية لدى الأطفال الصغار والرضع في ذلك الوقت، لأول مرة في الولايات المتحدة في فبراير 2000.

كما أن PrevnarTM 13 (Wyeth) هو عبارة عن لقاح مصرح به يحتوي على مترافقات conjugates عديدات السكاريد من الأنماط المصلية 6A، 6B، 19A، 19F بالإضافة إلى 1، 3، 4، 5، 7F، 9V، 14، 18C و23F. SynflorixTM (GSK) عبارة عن لقاح آخر مصرح به يوفر الحماية ضد 1، 4، 5، 6B، 7F، 9V، 14، 18C، 19F، و23F وحماية شاملة ضد 19A و6A.

يجب أن تكون تركيبات اللقاحات مستقرة بشكل عام وفي شكل متسق لتلبية الحاجة إلى فترة تخزينية طويلة واستخدام عبوات تتضمن جرعات متعددة. تتعرض اللقاحات القائمة على البروتينات، التي تشتمل على مترافقات conjugates عديد السكاريد- البروتينات، لتراكم البروتينات وترسبها بما قد يؤدي إلى وجود تركيز إجمالي أقل غير فاعل من اللقاح بسبب عدم إتاحة ناتج البروتين المترسب. تظهر لقاحات مترافق عديد السكاريد- البروتين، على وجه الخصوص، ميلًا أقوى نحو التراكم أكثر من البروتين الناقل carrier protein بمفرده (انظر Berti et al، 2004، Biophys J 86:3-9). قد يؤثر اختيار تركيبة لقاح مترافق عديد السكاريد- البروتين polysaccharide-protein conjugate إلى حد كبير على تراكم البروتين. انظر Ho et al.، 2001، Vaccine 19:716-725 .

بالرغم من وجود العديد من تركيبات لقاحات مترافق عديد السكاريد- البروتين polysaccharide-protein conjugate للمكورة الرئوية عديدة التكافؤ التي تم تطويرها على مستوى العالم، لا تزال هناك حاجة مستمرة في المجال للحصول على تركيبات لقاح توفر قدرة عالية على امتزاز المترافقات conjugates الفردية وتكون خالية من تراكم/ ترسيب التركيبات ذات النشاط المناعي التي تحتوي على مترافقات conjugates عديد السكاريد- البروتين.

تتمثل العوامل المساعدة المستخدمة بشكل تقليدي في لقاحات المكورة الرئوية pneumococcal عديدة التكافؤ المذكورة في أملاح الألمونيوم مثل هيدروكسيد الألمونيوم وفوسفات الألمونيوم. تعرف العديد من العوامل المساعدة التجريبية الأخرى، بينما يبقى الامتزاز لأملاح الألمونيوم هو التركيبة

المساعدة للقاح الأكثر شيوعًا. بالرغم من انتشار استخدامها على نطاق واسع، قد لا تكون أملاح الألمونيوم متوافقة في الغالب مع مستضدات معينة بما يؤدي إلى وجود تغييرات كبيرة فيما يتعلق بنسبة امتزاز مترافق عديد السكاريد- البروتين polysaccharide-protein conjugate على الألمونيوم أو النشاط الاستمناعيimmunogenicity.

تعتمد الخواص المناعية وثبات اللقاح المترافق المرشح الممتز على العوامل المساعدة من الألمونيوم على مؤشرات متعددة مثل 1) النشاط الاستمناعي immunogenicity لكل مستضد antigen، 2) نوع البروتين الناقل carrier protein المستخدم في الترافق، و3) نوع العامل المساعد المستخدم. وبشكل أكثر أهمية، تبين قبل ذلك أن نطاق امتزاز المستضد antigenعلى العامل المساعد يعد أحد المؤشرات المهمة التي تظهر اتساق بين الكميات في عملية التركيب ويمكنها التأثير على فاعلية ناتج اللقاح. بالإضافة إلى ذلك، قد تنخفض نسبة امتزاز مترافقات conjugates عديد السكاريد- البروتين polysaccharide-protein conjugatesأكثر على تخزين التركيبة أو في ظل حالات سيئة مثل تغير درجات الحرارة. ارجع إلى 54th meeting of the WHO Expert Committee on Biological Standardization، Recommendations for the production & control of Pneumococcal conjugate vaccines، 17-21 November 2003؛ Carl E. Frasch ، Session IV: Conjugate Vaccines؛ Vaccine Technology II؛ 2008 .Portugal.

وفقًا للمبادئ التوجيهية لوكالة الأدوية الأوروبية European regulatory agency الخاصة بمترافقات conjugates عديد سكاريد- بروتين المكورة الرئوية، يجب اعتبار اكتمال الامتزاز (نسبة المترافق غير المرتبط) كمعيار تحكم جودة جوهري مع محتوى الألمونيوم ودرجة التعقيم والهوية والمحتوى الخالي من عديد السكاريد. ارجع إلى Assessment Report for Synflorix، Procedure No. EMEA/H/C/000973، 2009 . توصي منظمة الصحة العالمية بزيادة

درجة الامتزاز للمستضدات المترسبة بالألمونيوم (ذوفان الخُناق diphtheria وذوفان الكُزاز tetanus) حيث يتم امتزاز 80% على الأقل من المستضدات في هذه اللقاحات.

أثناء تصنيع مترافق عديد السكاريد- البروتين، قد يشتمل الفورميولات على تراكمات من نوع عديد السكاريد- عديد السكاريد أو نوع بروتين- بروتين أو نوع عديد السكاريد- بروتين. يتم ملاحظة وجود هذه التراكمات أيضًا في الناتج النهائي بما يؤدي إلى رفض ما يتراوح من 4% إلى 10% من الزجاجات الممتلئة بلقاح مترافقات conjugates عديد السكاريد- البروتين، بما يؤثر على ثبات وفاعلية لقاح المترافقات conjugates.

مع مراعاة القيود المنصوص عليها أعلاه فيما يتعلق بتراكم وثبات عديد السكاريد والمترافق الخاص به، لا تزال هناك حاجة مستقلة تتمثل في الحد من تراكم وثبات عديد السكاريد المذكور على مستوى المعالجة البعدية للوصول إلى مرحلة التركيب النهائية من تصنيع لقاح مترافق المكورة الرئوية.

الوصف العام للاختراع

ينص الاختراع على تحسينات في ثبات اللقاحات التي تشتمل على أملاح الألمونيوم، وخاصة طرق للحد من التراكم وتحسينات في نسبة امتزاز المترافقات conjugates الفردية في لقاحات مترافقات conjugates عديد السكاريد- البروتين polysaccharide-protein conjugates للمكورة الرئوية عديدة التكافؤ. لاحظ القائمون بالاختراع الحالي أن الامتزاز المشترك لمترافقات conjugates عديد السكاريد- البروتين polysaccharide-protein conjugatesواستخدام نسبة من عديد السكاريد إلى البروتين polysaccharide to protein ratio تزيد على 1: 1 يؤدي إلى 1) نسبة امتزاز أقل من 55% فيما يتعلق بمترافقات conjugates المكورة الرئوية pneumococcal للأنماط المصلية 6A، 9V و23F و2) وجود نسبة امتزاز تتراوح من حوالي 80% إلى 90% فيما يتعلق بمترافقات conjugates الأنماط المصلية المتبقية، بما لا يحقق نسبة امتزاز كاملة لمترافق نمط مصلي فردي فيما يتعلق بتركيبة مترافقات conjugates مكورة

رئوية عديدة التكافؤ. من الملحوظ أيضًا أن تركيبة اللقاح المحضرة باستخدام رقم هيدروجيني يتراوح من 6.8 إلى 7.0 تؤدي إلى وجود تراكم يتراوح من حوالي 4 إلى 10% وامتزاز أقل.

يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لتحضير تركيبة لقاح مترافق بروتين المكورة الرئوية pneumococcal متعددة السكاريد، تظهر امتزاز مثالي يتراوح من 75 إلى 99% لكل مترافق حيث يُمنع التراكم في الطريقة المذكورة باستخدام عنصر واحد على الأقل مما يلي:

أ) امتزاز فردي أو منفصل للمترافقات conjugates التي تظهر بخلاف ذلك امتزاز أقل نسبيًا بالامتزاز المشترك؛

ب) نظام منظم هيستيدين histidine buffer system– حمض السكسينك مع وجود تغير في الرقم الهيدروجيني من رقم هيدروجيني محايد إلى رقم هيدروجيني حمضي؛

ج) وجود نسبة من عديد السكاريد إلى البروتين polysaccharide to protein ratio تتراوح من 0.6 إلى حوالي 1.4؛ و

د) استخدام دافع توربيني turbine impeller من نوع Rushton مزود بستة أنصال في وعاء التحضير.

يفصح الاختراع الحالي أيضًا عن طريقة لتحضير مترافقات conjugates عديد السكاريد–البروتين polysaccharide–protein conjugates ذات نشاط استمناعي immunogenicity مُحسن ومحتوى أقل خالي من عديد السكاريد للحصول على عديد سكاريد للمكورة الرئوية يحتوي على رابط فسفودايستر phosphodiester linkage، وخاصة 19A، 19F، 6A و6B. تحد عملية الترافق المذكورة من التحلل المتوسط بالناتج الثانوي لعامل التحول إلى سيانات لعديد السكاريد محدد الحجم ومنع تراكم عديد السكاريد– عديد السكاريد بما يؤدي إلى ثبات عديدات السكاريد ذات الطبيعية غير المستقرة. قد يرجع السبب الرئيسي في الحد من التراكم إلى استخدام عديد سكاريد ذو حجم معين يتراوح من 100 إلى 200 ك دالتون، ونسبة من عديد السكاريد إلى CDAP (عامل التحول إلى سيانات) في نطاق (1) :(0.8 – 1).

تؤدي التركيبة ذات النشاط الاستمناعي immunogenicity المحضرة وفقًا للاختراع الحالي إلى الحد من التراكم بين عديد السكاريد- عديد السكاريد ومترافق عديد السكاريد- البروتين polysaccharide-protein conjugateمع وجود تحسن في الثبات والنشاط الاستمناعي.

شرح مختصر للرسومات

الشكل 1: مستوى SEC-HP-RI بحجم PnPs 19A (178 ك دالتون) قبل معالجة DMAP.

الشكل 2: مستوى SEC-HP-RI بحجم PnPs 19A (70 ك دالتون) بعد 24 ساعة (أ) و14.5 ك دالتون بعد 72 ساعة (ب) من مستويات التحلل بعلاج DMAP.

الشكل 3: مستويات SEC-HP-RI بحجم PnPs 19A (178 دالتون؛ أ) وتراكم قائم على الزمن بفعل عديدات السكاريد المنشطة بـ CDAP-(5B، 5C و5D)،5E (مترافق بدون 10 ك دالتون DF)، 5F (مترافق مع 10 ك دالتون DF)،5G-بحجم 5H/19A-المفعل بـ 19A(نسبة Ps:CDAP معدلة بمقدار 1:1 فيما يتعلق بـ 19A) لطريقة ترافق بدون الاستعانة بخطوة الترشيح الثنائي بحجم 10 ك دالتون.

الشكل 4: مستويات SEC-HP-RI بحجم PnPs 19F (157 ك دالتون؛ أ) وتراكم قائم على الزمن بفعل عديدات السكاريد المنشطة بـ CDAP-(ب)، 6D/6C (نسبة Ps:CDAP معدلة 1:1 فيما يتعلق بـ 19F) لطريقة ترافق بدون الاستعانة بخطوة الترشيح الثنائي بحجم 10 ك دالتون.

الشكل 5: دافع توربيني turbine impeller من نوع Rushton مزود بستة أنصال مسطحة.

الشكل 6: بروتوكول امتزاز.

الوصف التفصيلي:

يتم تحديد الاختراع الحالي في مجموعة عناصر الحماية الملحقة.

أي ميزة فنية لم يتم تضمينها في نطاق المطالبات الملحقة هي للعلم فقط.

يهدف الافصاح إلى توفير تحسينات في ثبات اللقاحات التي تشتمل على أملاح الألمونيوم، وخاصة طرق للحد من التراكم وتحسينات في نسبة امتزاز المترافقات conjugates الفردية في لقاحات مترافقات conjugates عديد السكاريد- البروتين polysaccharide-protein conjugatesللمكورة الرئوية عديدة التكافؤ. لاحظ القائمون بالافصاح الحالي أن الامتزاز المشترك لمترافقات conjugates عديد السكاريد- البروتين polysaccharide-protein conjugates واستخدام نسبة من عديد السكاريد إلى البروتين polysaccharide to protein ratio تزيد على 1: 1 يؤدي إلى 1) نسبة امتزاز أقل من 55% فيما يتعلق بمترافقات conjugates المكورة الرئوية pneumococcal للأنماط المصلية 6A، 9V و23F و2) وجود نسبة امتزاز تتراوح من حوالي 80% إلى 90% فيما يتعلق بمترافقات conjugates الأنماط المصلية المتبقية، بما لا يحقق نسبة امتزاز كاملة لمترافق نمط مصلي فردي فيما يتعلق بتركيبة مترافقات conjugates مكورة رئوية عديدة التكافؤ. من الملحوظ أيضًا أن تركيبة اللقاح المحضرة باستخدام رقم هيدروجيني يتراوح من 6.8 إلى 7.0 تؤدي إلى وجود تراكم يتراوح من حوالي 4 إلى 10% وامتزاز أقل.

تم استزراع عديد سكاريد باتباع الطريقة المنصوص عليها في براءة الاختراع رقم WO2013088448A1، حيث تتألف الطريقة المذكورة من (أ) توفير لقاح من سلالة بكتيرية تعبر عن CP؛ (ب) استزراع السلالة عن طريق التخمير في رقم هيدروجيني بمقدار 7.2، حيث يعادل إضافة معدل وسيط التغذية معدل إضافة مزيج قلوي للحفاظ على الرقم الهيدروجيني المحدد مسبقًا؛ (ج) استزراع وسيط المزرعة في درجة حرارة من 35 إلى 38 درجة مئوية مع التقليب بمعدل من 50 إلى 150 دورة في الدقيقة مع تدفق هواء بمعدل من 0.1 إلى 0.5 vvm.

تم تنقية عديد السكاريد باتباع الطريقة المنصوص عليها في براءة الاختراع رقم WO2012127485. يبين Pn-Ps المحضر باتباع العملية الحالية نسبة استرجاع تتراوح من حوالي 60 إلى 70%، حيث انخفضت نسبة التلوث بعديد السكاريد- ج بنسبة تتراوح من 1 إلى 5 أضعاف بالمقارنة مع محتوى C-Ps فيما بعد الاستشراب المتفاعل غير الآلف للمياه Hydrophobic interaction chromatography(HIC) أو لكل استشراب تبادل أيوني ion

exchange chromatography (IEC)، ويقل تلوث البروتين عن 1% ويثل تلوث الحمض النووي عن 1%. تم إجراء العملية المذكورة على المستوى البحثي والتجريبي والتجاري.

يمكن لهذه العملية تنقية عديدات السكاريد مع استهلاك وقت أقل بمقدار من 80 إلى 90% وتكلفة أقل بمقدار 90% بالمقارنة بالطرق القائمة على CTAB/الكحول.

وفقًا لأحد النماذج المهمة المقدمة على الافصاح الحالي، يمكن الحصول على نسبة امتزاز مُحسنة تتراوح من 75 إلى 95% لمترافقات conjugates المكورة الرئوية pneumococcal عن طريق 1) الاستعانة بنسبة من عديد السكاريد إلى البروتين polysaccharide to protein ratio بمقدار من 0.8 إلى 1.4، 2) الاستعانة بامتزاز فردي أو منفصل لمترافقات conjugates المكورة الرئوية pneumococcalضعيفة الامتزاز، 3) الحفاظ على انخفاض الرقم الهيدروجيني أثناء التركيب.

وفقًا لأحد جوانب النموذج الأول، تكون النسبة المفضلة من عديد السكاريد إلى البروتين بمقدار 1:1.

وفقًا لجانب ثاني من الجانب الأول، تشتمل التركيبة المذكورة على مترفقي بروتين عديد سكاريد على الأقل يحتويان على عديد سكاريد مختار من الأنماط المصلية 1، 2، 3،4،5، 6A، 6B،7F، 8،9V،9F،9N، 12F، 14، 15B، 17F،18C، 19A، 19F،20،22F،23F،33F و45

وفقًا لجانب ثالث من الجانب الأول، يمكن الاستعانة بوضع الامتزاز الفردي لأي نمط مصلي للمكورة الرئوية مختار من 2، 3، 4، 6A، 8، 9V، 9F، 9N، 12F، 15B، 17F، 18C، 20، 22F، 23F، 33F و45، ويفضل للأنماط المصلية الخاصة بالمكورة الرئوية pneumococcal 6A، 9V، و23F.

وفقًا لأحد الجوانب المفضلة من الجانب الأول، يكون لقاح مترافق المكورة الرئوية pneumococcalعديد التكافؤ multivalentعلى 10 تكافؤ حيث يتم امتزاز الأنماط المصلية للمكورة الرئوية 16A، 9V، و23F كمزيج منفصل ثم تتم الإضاءة إلى مزيج آخر يحتوي على

خليط من الأنماط المصلية للمكورة الرئوية 1،5،6B،7F، 14، 19A و19F التي تم امتزازها في الوضع المشترك.

وفقًا لجانب آخر مفضل من النموذج الأول، يحتوي لقاح مترافق المكورة الرئوية pneumococcalعديد التكافؤ multivalentعلى 11، 13، 15 ،16 تكافؤ أو أكثر حيث يتم امتزاز نمط مصلي واحد على الأقل من المكورة الرئوية pneumococcal منتقي من مجموعة تشتمل على 2، 3،4،6A، 8،9V،9F،9N، 12F، 15B،17F،18C،20،22F،23F،33F و45 فرديًا أو الامتزاز في مجموعة أصغر كخليط منفصل ثم يضاف إلى مزيج آخر يحتوي على خليط من الأنماط المصلية للمكورة الرئوية 1،5،6B،7F، 14، 19A و19F الممتزة في الوضع المشترك.

وفقًا لجانب آخر مفضل من الجانب الأول، يحتوي لقاح مترافق المكورة الرئوية pneumococcalعديد التكافؤ multivalent على 16 تكافؤ، حيث يتم امتزاز نمط مصلي واحد على الأقل من المكورة الرئوية pneumococcal منتقي من مجموعة تشتمل على 2، 3، 4، 6A، 9V، 12F، 15B، 18C، و23 Fفرديًا أو الامتزاز في مجموعات أصغر كخليط منفصل ثم يضاف إلى مزيج آخر يحتوي على خليط من الأنماط المصلية للمكورة الرئوية 1،5،6B،7F، 14، 19A و19F الممتزة في الوضع المشترك combined mode.

يتم النص على الجانب ثاني مقدم على الافصاح الحالي حيث يمكن منع التراكم في تركيبة مترافق عديد سكاريد- بروتين للمكورة الرئوية عديد التكافؤ multivalent بالكامل عن طريق 1) الاستعانة بالتحول في الرقم الهيدروجيني من رقم هيدروجيني محايد إلى رقم هيدروجيني حمضي و2) الاستعانة بتوليفة منظم هيستيدين- حمض السكسينك Succinic - histidine buffer acid.

وفقًا لأحد جوانب النموذج الثاني، قد يتم التحول في الرقم الهيدروجيني المذكور من 6.8 إلى رقم هيدروجيني يتم اختياره من دون أن يقتصر على 5.2، 5.3، 5.4، 5.5، 5.6، 5.7،5.8 و5.9. ويفضل أكثر من 6.8 إلى رقم هيدروجيني مختار من 5.4،5.5،5.6،5.7 و5.8.

وفقًا لجانب آخر على الجانب الثاني، قد يحتوي نظام منظم الهيستيدين- حمض السكسينك Succinic acid –histidine buffer المذكور على تركيز يتراوح من 1 مللي مولار إلى 200 مللي مولار. يفضل أن يكون التركيز 1 مللي مولار على الأقل 1 مللي مولار (على سبيل المثال كحد أقصى، 200 مللي مولار، 150 مللي مولار، 100 مللي مولار، 90 مللي مولار، 80 مللي مولار، 70 مللي مولار، 60 مللي مولار، 50 مللي مولار، 40 مللي مولار، 30 مللي مولار، 20 مللي مولار، 10 مللي مولار وغير ذلك). وبشكل أكثر تفضيلًا، يتراوح تركيز منظم الهيستيدين- حمض السكسينك في التركيبة من 10 مللي مولار إلى 40 مللي مولار.

تم النص على الجانب ثالث مقدم على الافصاح الحالي حيث يمكن منع تكون الكتل أو التراكم في مترافقات conjugates المكورة الرئوية pneumococcal باستخدام دافعات من نوع rushton ذات نواصل مسطحة بدلًا من التقليب المغناطيسي والدافعات ذات النوع المحوري أو القُطري في أوعية التحضير.

يتحدد ثبات التركيبة ذان النشاط الاستمناعي immunogenicity المنصوص عليها في الافصاح الحالي بالفعل باستخدام أساليب قياسية المعروفة جيدًا والمستخدمة بشكل روتيني من جانب المتمرسين في المجال. على سبيل المثال، تتحلل التركيبة ذات النشاط الاستمناعي immunogenicityللتعرف على نسبة امتزاز المترافقات conjugates والثبات والتراكم والنشاط الاستمناعي immunogenicity وتكوين الجسيمات وفقدان (تركيز) البروتينات وما شابه ذلك باتباع طرق تشتمل دون أن تقتصر على، ELISA، التشتت الضوئي، الكثافة البصرية، الطرد المركزي لسرعة الترسيب، الطرد المركزي لاتزان الترسيب، ازدواج اللون الدائري (CD)، مقايسة Lowry، مقايسة حمض بيسينتشونينيك (BCA) وما شابه ذلك.

في أحد الجانب المفضل، ينص الافصاح الحالي على ELISA جديد يمكنه تحديد كم عديد السكاريد المقترن/ المرتبط مباشرًة بدون التأثير على النشاط الاستمناعي Immunogenicity للمترافقات conjugates الموجودة في لقاحات مترافقات conjugates المكورة الرئوية pneumococcalعديدة التكافؤ. يمكن اتباع نفس الطريقة في تحديد كم محتوى المترافق غير الممتز في قالب التركيبة كمؤشر يدل على نسبة الامتزاز حيث تبين المترافقات conjugates امتزاز بنسبة أكبر من 70%. يفضل إمكانية استعانة ELISA المذكور بخطوة ما قبل المقايسة

تتضمن امتزاز المترافق من مساعد الألمونيوم بدون التأثير على النشاط الاستمناعي immunogenicity للبروتين الناقل carrier protein وعديد السكاريد المترافق. وبشكل أكثر تحديدًا، يتحقق حل عينات المترافق الممتز بالألمونيوم باستخدام هيدروكسيد الصوديوم وحمض الستريك.

يمكن انتقاء الناقل من مجموعة تشتمل دون أن تقتصر على CRM197، ذوفان الخُناق، ذوفان الكُراز، الجزء ج من كُراز الذوفان، ذوفان السعال الديكي، البروتين د من الإنفلونزا إتش، إيشريشيا إيكولاي LT، إيشريشيا إيكولاي ST، والذيفان الخارجي أ من زائفة زنجارية، مركب الغشاء الخارجي ج (OMPC)، البروتينات، بروتينات ارتباط ترنسفيرين، نيومولسين، البروتين السطحي للمكورة الرئوية أ(PspA) ، حبة الالتصاق السطحي للمكورة الرئوية أ(PsaA)، PhtD للمكورة الرئوية، البروتينات السطحية للمكورة الرئوية BVH-3 و BVH-11، مستضد antigen واقي (PA) للعصوية الجمرية وعامل الاستسقاء المزيل للسموم (EF) والعامل القاتل (LF) من العصوية الجمرية، ألبومين، هيموسيانين اللِّزِيق(KLH)، الألبومين المصلي البشري، الألبومين المصلي للأبقار (BSA) ومشتق بروتين نقي من التوبركولين (PPD)، وخاصة CRM197 أو P4.

وفقًا للجانب المفضل، قد تشتمل التركيبة عديدة التكافؤ على:

١) مترافق بروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على CRM197 كبروتين ناقل carrier protein، وبروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على TT كبروتين ناقل carrier protein؛ أو

٢) مترافق بروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على CRM197 كبروتين ناقل carrier protein، وبروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على DT كبروتين ناقل carrier protein؛ أو

٣) مترافق بروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على CRM197 كبروتين ناقل، وبروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على حبة التصاق سطحية للمكورة الرئوية أ (PsaA) كبروتين ناقل carrier protein؛ أو

٤) مترافق بروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على CRM197 كبروتين ناقل، وبروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على TT كبروتين ناقل، وبروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على DT كبروتين ناقل؛ أو

٥) مترافق بروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على CRM197 كبروتين ناقل، وبروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على TT كبروتين ناقل، وحبة التصاق سطحية للمكورة الرئوية أ (PsaA) كبروتين ناقل؛ أو

٦) مترافق بروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على CRM197 كبروتين ناقل، وبروتين عديد سكاريد واحد على الأقل يحتوي على DT كبروتين ناقل، وحبة التصاق سطحية للمكورة الرئوية أ (PsaA) كبروتين ناقل.

في الجانب آخر، يتمثل البروتين الناقل carrier protein المفضل المترافق مع النمط المصلي 3serotype في CRM-197، والنمط المصلي 4serotype في TT أو DT والنمط المصلي 18Cserotype في CRM197.

يتضمن الجانب آخر مفضل مقدم على الافصاح الحالي استخدام PsaA كبروتين ناقل في التركيبة النهائية. يمكن استخدام PsaA أيضًا في التركيبة النهائية كعامل مساعد.

في بعض الجوانب ، قد تحتوي التركيبة عديدة التكافؤ المنصوص عليها في الافصاح الحالي على خافض للتوتر السطحي، يفضل أن يتمثل في البوليسوربات 20. في بعض الجوانب ، يتراوح التركيز النهائي للبوليسوربات 20 في التركيبة من 0.01% إلى 10% من البوليسوربات 20 بالوزن/ حجم التركيبة. في الجوانب أخرى أيضًا، يكون التركيز النهائي للبوليسوربات 20 في التركيبة 0.01% بالوزن/ حجم التركيبة. في الجوانب أخرى أيضًا، يكون التركيز النهائي للبوليسوربات 20 في التركيبة 0.05% بالوزن/ حجم التركيبة. في الجوانب أخرى أيضًا، يكون التركيز النهائي للبوليسوربات 20 في التركيبة 0.1% بالوزن/ حجم التركيبة. في الجانب آخر، يكون التركيز النهائي للبوليسوربات 20 في التركيبة 1.0% بالوزن/ حجم التركيبة. في الجانب آخر أيضًا، يكون التركيز النهائي للبوليسوربات 20 في التركيبة 10.0% بالوزن/ حجم التركيبة.

قد تحتوي تركيبات اللقاح عديد التكافؤ multivalent الحالي على مواد حافظة مختارة من مجموعة تشتمل دون أن تقتصر على مواد حافظة زئبقية (مثل ثيمْيروسال)، 2-فينوكسي- إيثانول، بارابين الميثيل، بارابين البروبيل، الكحول البنزيلي (أو أمزجة منهم).

وفقًا لأحد الجوانب المفضلة المقدمة على الاختراع الحالي، من الممكن أن تحتوي تركيبة لقاح مترافق عديد السكاريد- بروتين للمكورة الرئوية عديدة التكافؤ المذكورة، يفضل 10 أو 16 تكافؤ، على المترافقات conjugates الممتزة بفوسفات الألمونيوم، هيستيدين، حمض السكسينيك، كلوريد الصوديوم، بوليسوربات20 ، والثيوميرسال.

قد تشتمل تركيبة اللقاح المنصوص عليها في الاختراع الحالي على خطوة إضافة مساعد ملح الألومنيوم بكمية 20-375 ميكروجم، 20-300 ميكروجم، 20-200 ميكروجم، 25-150 ميكروجم من Al+++ لكل جرعة بمقدار 0.5 مل.

وبشكل نمطي، تُحضر التركيبات ذات النشاط الاستمناعي immunogenicity في شكل قابلة للحقن، سواء محاليل مائعة أو معلقات؛ أو أشكال صلبة ملائمة للذوبان في المحلول أو في المعلق، ويمكن أيضًا تحضير وسائل مائعة قبل الحقن. يمكن استحلاب التركيبة أيضًا أو دمجها في جسيمات شحمية لتعزيز تأثير العامل المساعد. سيكون التعاطي المباشر للتركيبات عن طرق الحقن بشكل عام (الحقن أو الحقن تحت الجلد أو الحقن داخل الصفاق أو الحقن الوريدي أو الحقن العضلي أو التعاطي عن طريق المساحة الانفراجية للنسيج). يمكن وضع التركيبات أيضًا في أحد الجروح. تشتمل طرق تعاطي أخرى على التعاطي عن طريق الفم أو الرئة أو الأقماع أو بطريق الأدمة أو إبر الوخز في الجلد أو الحاقن النفاث. قد يتمثل العلاج بالجرعات في جدول زمني بجرعة مفردة أو جدول زمني بجرعات متعددة (بما في ذلك الجرعات المعززة).

بشكل مفضل، يمكن تخزين اللقاحات المنصوص عليها في الافصاح الحالي في شكل محلول أو شكل مجفد، حيث يمكن أن تتمثل تركيبة اللقاح المجفدة من الافصاح الحالي في تركيبة تشتمل على 1 أو 5 أو 10 جرعات مع مخفف يحتوي على هلام فوسفات الألمونيوم وNaCl.

يتضمن الجانب آخر مقدم على الافصاح الحالي استخدام دافع من نوع Rushton مزود بأنصال مسطحة في وعاء التحضير (ارجع إلى الشكل 5).

الأمثلة:

المثال 1: التخمير

تتألف الطريقة من (أ) توفير لقاح من سلالة بكتيرية تعبر عن CP؛ (ب) استزراع السلالة عن طريق التخمير في رقم هيدروجيني بمقدار 7.2، حيث يعادل إضافة معدل وسيط التغذية معدل إضافة مزيج قلوي للحفاظ على الرقم الهيدروجيني المحدد مسبقًا؛ (ج) استزراع وسيط المزرعة في درجة حرارة من 35 إلى 38 درجة مئوية مع التقليب بمعدل من 50 إلى 150 دورة في الدقيقة مع تدفق هواء بمعدل من 0 إلى 0.5 vvm.

المثال 2: تنقية عديد السكاريد المحفظي

تنقية النمط المصلي serotypeلعديد السكاريد المحفظي للمكورة الرئوية 19F (HIC يعقبه IEC)

تم تركيز 5 ل نقي من مستزرعات تخمير النمط المصلي serotypeللمكورة الرئوية 19F وإجراء ترشيح مخفف إلى 500 مل باستخدام غشاء MWCO بمقدار 100 ك دالتون. تم إجراء الترشيح الثانئي باستخدام 25 ميكرو مولار من منظم فوسفات الصوديوم عتد رقم هيدروجيني محايد يعقبه الترشيح الثنائي بالمياه للحقن (WFI).

تم إضافة نوكلياز إلى محلول عديد السكاريد للحصول على تركيز نهائي بمقدار 8 وحدة/ مل من المحلول. تمت المعالجة بالإنزيم عند 370 درجة مئوية لمدة 10 ± 2 ساعة مع التقليب.

تم إضافة كبريتات الأمونيوم إلى محلول عديد السكاريد المعالج بالنوكلياز بتشبع 50% والاحتضان عند 2 – 80 مئوية لمدة 12 ± 2 ساعة (باستثناء الأنماط المصلية 5 و4). تم تعريض المزيج للطرد المركزي. تم التخلص من الحبيبات (الراسب). تعرض المحلول (حوالي 500 مل) إلى الترشيح الثنائي 100 ك دالتون باستخدام NaCl يعقبه WFI المبرد. تم تحميل هذا المحلول المعرض للترشيح الثنائي الذي يحتوي على عديد السكاريد مع منظم وتركيز عالي من الملح على عمود HIC.

تم توازن عمود الاستشراب المتفاعل غير الآلف للمياه Hydrophobic interaction chromatography(300 مل) مع 50% من منظم كبريتات الأمونيوم المشبعة ومحلول عديد السكاريد (500 مل) ثم تحميله على عمود في نطاق رقم هيدروجيني يتراوح من 6 إلى 8، ويفضل أن يتراوح من 6 إلى 7. تم غسل العمود أيضًا بمحلول منظم يحتوي على 50% من كبريتات الأمونيوم المشبعة. في ظل هذه الظروف، تم استرجاع عديد السكاريد في تدفق وغسل توازن من العمود.

تم تركيز محلول عديد السكاريد بعد ذلك باستخدام مرشح MWCO بحجم 100 ك دالتون ثم تعريضه للترشيح الثنائي مع NaCl والمياه المخصصة للحقن (WFI).

تم توازن عمود استشراب تبادل الأيونات (300 مل) مع 20 ميكرو مولار من منظم فوسفات الصوديوم ومحلول عديد السكاريد (500 مل) ثم تحميله على عمود في نطاق رقم هيدروجيني يتراوح من 6 إلى 8، ويفضل أن يتراوح من 6.5 إلى 7.5. تم غسل العمود بعد ذلك بالمنظم. تم استخلاص عديدات السكاريد باتباع خطوة استخراج تدريجي باستخدام 1.0 مولار من NaCl (تم استخراج عديدات سكاريد متعددة بقوى أيونية مختلفة من NaCl).

تم تركيز محلول عديد السكاريد بعد ذلك باستخدام مرشح MWCO بحجم 100 ك دالتون ثم تعريضه للترشيح الثنائي مع المياه المخصصة للحقن (WFI).

تم ترشيح محلول عديد السكاريد المتعرض للترشيح الثنائي باستخدام مرشح غشائي بحجم 0.22 ميكرو في زجاجات من مادة البروبلين. تم تخزين عديد السكاريد المرشح في حالة مجمدة عند −20±50 م.

تم اتباع العملية المذكورة أعلاه أيضًا فيما يتعلق بالأنماط المصلية 4،6A، 6B، 7F، 9V، 10A،14، 18C، 19A، 19F، و23F.

النتائج:

تم تقييم عديد السكاريد- ج ما بعد HIC وما بعد استشراب تبادل الأيونات باستخدام نطاق NMR H1/P31. أدت العملية إلى انخفاض في محتوى الملوثات بما يتراوح من 2 إلى 3 أضعاف.

المثال 3: تحديد حجم عديدات السكاريد

تم استخدام جهاز تجانس (الموائع الدقيقة) للحد من الوزن الجزيئي لعديد السكاريد قبل خطوة التفعيل. فيما يتعلق بـ 19A، تم تقليل الحجم عند 24-28 KPSI، ولكن فيما يتعلق بـ 19F، تم تقليل الحجم عند 26-30 KPSI حيث كان عدد التمريرات يتراوح من حوالي 1 إلى 3. تم تعريض عديدات السكاريد محددة الحجم إلى الترشيح الثنائي والتركيز يعقبه الترشيح بحجم 0.22 ميكرو. تم تعريض عديدات السكاريد محددة الحجم بعد ذلك إلى HPSEC-RI لتقييم الوزن الجزيئي المتوسط.

المثال 4: عملية الترافق العامة

تم إجراء ترافق عديد السكاريد إلى بروتين ناقل باستخدام طريقة الترافق CDAP لليس وآخرين (اللقاح 26: 190-198، 1996). تم حل عديدات السكاريد ذات الحجم المخفض ميكانيكيًا (باستثناء 6A المستخدم في الشكل الأصلي أو ذو الحجم المحدد بناًء على حجم 6A) في NaCl 2M. تم إضافة CDAP (في شكل الأسيتونتريل) من محلول تخزين 100 ملجم/ مل إلى محلول عديد السكاريد وفقًا لنسبة عديد السكاريد:CDAP. بعد حوالي 1 دقيقة، تم إضافة 2 مولار من NaOH للحصول على رقم هيدروجيني معين للتفعيل. تم تفعيل عديد السكاريد عند هذا الرقم الهيدروجيني في مدة تتراوح من 4 إلى 10 دقائق عند 22 درجة مئوية. تم إضافية CRM-197 (تعتمد الكمية على نسبة Ps/البروتين الأولية) إلى عديد السكاريد المفعل وتم إجراء تفاعل مزدوج عند الرقم الهيدروجيني المحدد لمدة تتراوح من 3 إلى 8 ساعات بالاستناد على النمط المصلي. تم إخماد التفاعل بعد ذلك بالغليسين لمدة 1 ساعة عند 220 درجة مئوية وعند 120 درجة مئوية أثناء الليل. تمت تنقية المترافقات conjugates بعد ذلك بالترشيح الثنائي بما يتراوح من 300 ك دالتون إلى 500 ك دالتون يعقبه الترشيح الثنائي بمقدار 100 ك دالتون. تم بعد ذلك تحديد

محتوى عديد السكاريد والبروتين في المترافقات conjugates المرشحة والمنقاه بمرشح 0.22 مايكرومتر.

الجدول 1- متغيرات مقياس تفاعل الترافق الخاص بالنمط المصلي serotype فيما يتعلق بعشرة أنماط مصلية:

تفاصيل الترافق لعشرة أنماط مصلية										
الخصائص	ظروف العملية للأنماط المصلية المختلفة									
	1	5	6A	6B	7F	9V	14	19 A	19F	23F
تركيز Ps (ملجم/ مل)	4.5	5	5	11	10	8	10	9.5	9.5	9
الذوبان	2 مولار من NaCl	2 مولار من NaCl	2 مولار من NaCl	2 مولار من NaCl	2 مولار من NaCl	2 مولار من NaCl	2 مولار من NaCl	2 مولار من NaCl	2 مولار من NaCl	2 مولار من NaCl
وقت التفعيل (دقيقة)	4	4	4	4	4	4	4	4	10	4
نسبة Ps/CDAP	1:1.25	1:1	1:1	1:1.15	1:1.25	1:1.2	1:1.1	1:1	1:0.8	1:1.1
تركيز CRM 197 (ملجم/ مل)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
نسبة Ps/CRM	0.8	0.75	1.05	0.77	0.8	0.8	0.82	0.8	0.9	0.71

	6	6		7	5				2
9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5	09:09:09	9.5:9.5:..5	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5:	9.5:9.5:9.5
2.59	1.07	1.5	2.53	ND	1 >	1.57	2.63	6.3	1 >
ND	2.2	ND	ND	ND	ND	ND	2.2	1.54	ND
72.91	74.35	78.1	76.59	72.75	75.68	76.52	67.67	74.93	70.56

الجدول (2): مقارنة نسبة امتزاز الأنماط المصلية الفردية لتركيبات PCV-10 بطريقة الخلط الأحادي والمزدوج من التركيب.

م.	الأنماط المصلية لتركيبات PCV-10	طريقة الخلط الأحادي (جميع المستضدات مع بعضها) نسبة الامتزاز			طريقة الخلط المزدوج (الخليط أ والخليط ب) نسبة الامتزاز		
		التجربة-1	التجربة- 2	التجربة-3	التجربة-4	التجربة-5	التجربة-6
1	النمط المصلي 1serotype	90	85	92	99<	99<	97
2	النمط المصلي 5serotype	84	82	85	90	88	97

3	النمط المصلي serotype 6A	67	51	61	77	71	93
4	النمط المصلي serotype 6B	82	72	83	84	80	86
5	النمط المصلي serotype 7F	83	77	81	87	86	84
6	النمط المصلي serotype 9V	67	43	74	89	85	85
7	النمط المصلي serotype 14	86	83	88	92	91	90
8	النمط المصلي serotype 19A	95	92	97	95	93	85
9	النمط المصلي serotype 19F	91	87	93	91	88	75
10	النمط المصلي serotype	56	52	58	84	81	81

	23F						

في طريق الخلط الأحادي، تم امتزاز الأنماط المصلية 6A، 9V، و23F بشكل ضعيف في التركيبة، بينما كانت نسبة الامتزاز في طريقة الخلط المزدوج >70% فيما يتعلق بجميع الأنماط المصلية.

الجدول 3: تأثير التغير في الرقم الهيدروجيني على سلوك تراكم تركيبات PCV-10

م.	وصف التركيبة	نسبة رفض الزجاجات بسبب التراكمات (الجسيمات البيضاء/ التكتلات)		
		التجربة- 7	التجربة- 8	التجربة- 9
1	تركيبات PCV-10 بدون "تغير في الرقم الهيدروجيني"	10%	4%	6%
2	تركيبات PCV-10 بتغير في الرقم الهيدروجيني من 6.8 إلى 5.6-5.8	التجربة- 10	التجربة- 11	التجربة- 12
		لا يوجد تراكم (عدم الرفض عند الفرز)	لا يوجد تراكم (عدم الرفض عند الفرز)	لا يوجد تراكم (عدم الرفض عند الفرز)

لم يتم العثور على تراكمات للرقم الهيدروجيني 5.6-5.8 فيما يتعلق بالتركيبة PCV10 بالمقارنة بالرقم الهيدروجيني 6.8.

تبين أن نسبة عديد السكاريد إلى البروتين (1:1) لها تأثير نفعي على نطاق امتزاز مترافق المكورة الرئوية pneumococcal في التركيبة.

الجدول 4: تأثير نسبة Ps إلى CRM197 على امتزاز مترافق المكورة الرئوية pneumococcal (النمط المصلي 6Aserotype) في التركيبة

م.	النمط المصلي serotypeلمترافق المكورة الرئوية 6Apneumococcal	نسبة Ps إلى البروتين	نسبة الامتزاز
1	ZPN6ACP1201	1.95	34
2	ZPN6ACP1203	1.51	42
3	ZPN6ACP1204-A	1.32	87
4	ZPN6ACP1204-B	1.15	95
5	ZPN6ACP1205	1.09	86

تمت ملاحظة تأثير نسبة عديد السكاريد إلى البروتين على امتزاز المترافقات conjugates. أظهرت مترافقات 6A conjugates ذات نسبة Ps إلى البروتين بمقدار <1.5 امتزاز ضعيف. تحتوي معظم الأنماط المصلية المستخدمة في تركيبة PCV-10 على نسبة Ps: Pr في نطاق 0.6-1.3 بما أدى إلى امتزاز مثالي للأنماط المصلية المتعددة بما في ذلك النمط المصلي 6Aserotype. بالاستناد على بيانات الامتزاز المتحققة للنمط المصلي 6A وتركيبة PCV-10 عند تركيب 16 تكافؤ، يمكن استنتاج أن نسبة Ps: Pr للمترافقات conjugates الستة المتبقية الموجودة في نفس النطاق قد تضمن وجود امتزاز متسق لمترافقات conjugates جميع الأنماط المصلية الستة عشر.

الجدول 5: مواصفات الدافع التوربيني turbine impeller من نوع Rushton ذو الأنصال المسطحة للأوعية المختلفة

الحجم الهندسي (لتر)	14
الحجم العامل (لتر)	10.0
طول قطر النصل (ملم)	74.7

ارتفاع النصل (ملم)	17.3
عدد الأنصال	6
التحكم في الدوران (دورة في الدقيقة)	500-50
سرعة الطرف (م/ث)	1.95-0.19

المثال 6: بروتوكول ELISA

تم تحديد محتوى المستضدات ونسبة الامتزاز باستخدام Sandwich ELISA المعدل.

تم تعديل Sandwich ELISA التقليدي فيما يتعلق بظروف الاختبار/ ظروف المقايسة ومن ثم، فإنه يتسم بالسمات النفعية التالية

١) لتحديد كم عديد السكاريد المترافق في وجود 9 مستضدات مترافقة أخرى في لقاح يحتوي على 10 تكافؤ.

٢) لاستخلاص العشرة مترافقات conjugates بالكامل من هلام فوسفات الألمونيوم حيث يكون الامتزاز أكبر من 80%

3) حيث يتم التقاط المترافق حتى عند الرقم الهيدروجيني 9 بدون تعرض النشاط الاستمناعي immunogenicityللمترافق للضرر

تم تحديد محتوى المستضد antigenونسبة الامتزاز باستخدام ELISA وفقًا للبروتوكول المبين أدناه:

اليوم 1

1) تم تغليف الأطباق بجسم مضاد الالتقاط (جسم مضاد لا يتوافق مع البروتين الناقل carrier protein) يعقبه الاحتضان لمدة 0.5- 2 ساعة عند 35 ± 5 ° مئوية.

2) تم غسل الأطباق من 3 إلى 6 مرات باستخدام أداة غسل الأطباق ELISA.

3) تم حجب الأطباق بمنظم حاجب (3% BSA في 1X PBS ومنظم تريس للأنماط المصلية 14 و9V) ثم الاحتضان لمدة 1.5 – 2.5 ساعة عند 30 ±5° مئوية.

4) تم غسل الأطباق 3 مرات باستخدام أداة غسل الأطباق ELISA.

5) تم إضافة العينات إلى الأطباق.

6) تم احتضان الأطباق أثناء الليل عند 5±3 ° مئوية.

اليوم 2

1) تم السماح للأطباق بالوصول إلى درجة حرارة الغرفة.

2) تم إضافة جسم مضاد أولي بعد غسل الأطباق 3 مرات ثم الاحتضان في درجة حرارة الغرفة عند 25±2 لمدة 30 دقيقة ثم الغسل.

3) تم إضافة جسم مضاد ثانوي ثم الاحتضان عند 25±2 لمدة 30 دقيقة.

4) تم إضافة مادة TMB يعقبها الاحتضان في درجة حرارة الغرفة لمدة 15–20 دقيقة في الظلام.

5) تم إضافة محلول توقف.

6) تم قراءة الأطباق عند 450 نانومتر.

إجراء إذابة العينة بدون الإضرار بحاتمة البروتين الناقل carrier protein:

تم إضافة كمية ملائمة تتراوح من 0.5 إلى 2 مولار من NaoH إلى 2 مل من عينة اللقاح. تم تعريض العينة المذكورة إلى دوامة خفيفة لحين نقاء المحلول. تم تعديل الرقم الهيدروجيني للمحلول من 9 إلى 12 لحين نقاء المحلول. تم إرجاع الرقم الهيدروجيني للمحلول إلى 6–7.4 باستخدام كمية تتراوح من 0.5 مولار إلى 2 مولار من حمض الستريك. تم تعريض المحلول المذكور إلى

الطرد المركزي (العينات المذابة) عند 3000 إلى 6000 g x لمدة 5 دقائق وتم تجميع المادة الطافية بغرض الاختبار.

الجدول (6)

النمط المصلي serotype	دفعة 1		دفعة 2	
	المحتوى بالميكروجم/ مل	نسبة الامتزاز	المحتوى بالميكروجم/ مل	نسبة الامتزاز
النمط المصلي 1serotype	3.87	89	4.66	99.4
النمط المصلي 5serotype	3.57	83	4.03	90.8
النمط المصلي 6Aserotype	3.39	83	4.6	68.3
النمط المصلي 6Bserotype	8.01	80	6.8	85
النمط المصلي 7Fserotype	4.72	97	4.18	84.4
النمط المصلي 9Vserotype	4.61	80	3.95	70.4
النمط المصلي 14serotype	5.11	94	5.06	92.5
النمط المصلي	4.42	94	3.65	91.8

19Aserotype				
النمط المصلي 19Fserotype	4.35	82	4.14	81.4
النمط المصلي 23Fserotype	3.66	72	4.03	75

المثال 7: لقاح مترافق المكورة الرئوية- 10 تكافؤ (PCV10)

الجدول 7-تركيبة PCV10:

م	اسم المكون	الكمية/ الجرعة (0.5 مل)
1	النمط المصلي serotype لعديد السكاريد 1، 5، 6A، 7F، 9V، 14، 19A، 19F و23F*	2 ميكروجم لكل نمط
2	النمط المصلي serotype لعديد السكاريد 6B*	4 ميكروجم
3	Adju-Phos® فوسفات الألمونيوم	0.125 ملجم مثل Al+++
4	كلوريد الصوديوم	4.5 ملجم
5	حمض السكسينك	1.18 ملجم
6	البوليسوربات- 20	50 ميكروجم
7	الثيوميرسال (للتمثيل متعدد الجرعات فقط)	25 ميكروجم

8	L-هيستيدين	1.55 ملجم

*تم ترافق المكونات المشطة مع البروتين الناقل CRM197 carrier protein.

المثال 8: التركيبة 1 (PCV16)

لقاح مترافق المكورة الرئوية pneumococcal- 16 تكافؤ (PCV16)

5 الجدول 8-تركيبة PCV16 (1):

م.	التركيبات	الكمية/ الجرعة
المكونات النشطة*		
1	النمط المصلي serotype 1	2.0 ميكروجم
2	النمط المصلي serotype 2	2.0 ميكروجم
3	النمط المصلي serotype 3	2.0 ميكروجم
4	النمط المصلي serotype 4	2.0 ميكروجم
5	النمط المصلي serotype 5	2.0 ميكروجم
6	النمط المصلي serotype 6A	2.0 ميكروجم

7	النمط المصلي serotype 6B	4.0 ميكروجم
8	النمط المصلي serotype 7F	2.0 ميكروجم
9	النمط المصلي serotype 9V	2.0 ميكروجم
10	النمط المصلي serotype 12F	2.0 ميكروجم
11	النمط المصلي serotype 14	2.0 ميكروجم
12	النمط المصلي serotype 15B	2.0 ميكروجم
13	النمط المصلي serotype 18C	2.0 ميكروجم
14	النمط المصلي serotype 19A	2.0 ميكروجم
15	النمط المصلي serotype 19F	2.0 ميكروجم
16	النمط المصلي serotype 23F	2.0 ميكروجم
المكونات النشطة		

17	فوسفات الألمونيوم	NMT 1.25 ملجم من Al3+
18	هيستيدين	1.55 ملجم
19	البروتينات الناقلة	11.3 – 113.3 ميكروجم
20	حمض السكسينك	1.18 ملجم
21	كلوريد الصوديوم	4.5 ملجم
22	البوليسوربات- 20	50 ميكروجم
23	الثيوميرسال**	25 ميكروجم
24	WFI	كمية كافية

* تم ترافق المكونات النشطة من اللقاح مع بروتين ناقل واحد على الأقل مختار من CRM197، TT وDT.

** يضاف في تمثيل الجرعة المتعددة فقط

المثال 9: التركيبة 1 (PCV16)

الجدول 9-تركيبة PCV16 (2):

م.	التركيبات	الكمية/ الجرعة
المكونات النشطة*		
1	النمط المصلي serotype 1	2.0 ميكروجم
2	النمط المصلي serotype 2	2.0 ميكروجم

3	النمط المصلي serotype 3	2.0 ميكروجم
4	النمط المصلي serotype 4	2.0 ميكروجم
5	النمط المصلي serotype 5	2.0 ميكروجم
6	النمط المصلي serotype 6A	2.0 ميكروجم
7	النمط المصلي serotype 6B	4.0 ميكروجم
8	النمط المصلي serotype 7F	2.0 ميكروجم
9	النمط المصلي serotype 9V	2.0 ميكروجم
10	النمط المصلي serotype 12F	2.0 ميكروجم
11	النمط المصلي serotype 14	2.0 ميكروجم
12	النمط المصلي serotype 15B	2.0 ميكروجم
13	النمط المصلي serotype	2.0 ميكروجم

	18C	
14	النمط المصلي serotype 19A	2.0 ميكروجم
15	النمط المصلي serotype 19F	2.0 ميكروجم
16	النمط المصلي serotype 23F	2.0 ميكروجم
المكونات النشطة		
17	فوسفات الألمونيوم	1.25 NMT ملجم من Al3+
18	هيستيدين	1.55 ملجم
19	البروتينات الناقلة	11.3 – 113.3 ميكروجم
20	حمض السكسينك	1.18 ملجم
21	كلوريد الصوديوم	4.5 ملجم
22	البوليسوربات- 20	50 ميكروجم
23	2-فينوكسي إيثانول**	10 ملجم
24	مياه للحقن	كمية كافية

* تم ترافق المكونات النشطة من اللقاح مع بروتين ناقل واحد على الأقل مختار من CRM197، TT وDT.

** يضاف في تمثيل الجرعة المتعددة فقط.

المثال 10:

1) تحلل PnPs ذات الحجم المحدد (19A،19F،6A و6B) في وجود DMAP:

تم معالجة PnPs ذات الحجم المحدد في محلول تفاعل بـ DMAP بنسبة 1: 1.5 والتحقق من مستوى التحلل بواسطة SEC-HP-RI.

النتائج:

تبين تعرض PnPs 19A فقط للتحلل في وجود DMAP بينما بقيت PnPs الأخرى التي تحتوي على فسفودايستر (19F،6A و6B) كما هي بدون تحلل. ارجع إلى الشكلين 1 (بدون DMAP) و2 حيث يبين تحلل PnPs المتوسط بـ DMAP.

للحد من تحلل 19A هذا، تم تعريض PnPs النشط إلى ترشيح ثنائي بمقدار 10 ك دالتون باستخدام 2 مولار من NaCl لتحريك DMAP المتكون من محلول التفاعل قبل الترافق مع CRM197.

2) تحلل وتراكم PnPs ذات الحجم المحدد (19A،19F،6A و6B) في وجود CDAP:

تم معالجة PnPs محددة الحجم في محلول التفاعل بـ CDAP بنسبة 1: 1.5 أثناء التفعيل. تم ملاحظة تولد 501% من DMAP كناتج ثانوي (القياس بواسطة RP-HPLC) بما أدى إلى تحلل PnPs والتراكم بين PnPs المفعل بعد وقت معين من التفعيل (ارجع إلى الجدول 2) وتم التحقق من التحلل والتراكم بواسطة مستوى SEC-HP-RI. ارجع إلى الأشكال 3أ (بدون CDAP)، 3ب، 3ج و3د (فيما يتعلق بـ 19A) و4أ (بدونCDAP) 4ب (فيما يتعلق بـ 19F) التي تبين تحلل وتراكم PnPs بواسطة CDAP.

الجدول 10-العوامل المسؤولة عن الترابط العرضي والتراكم بين عديدات السكاريد وبعضها

تأثير "مدة تفعيل CDAP" على تكوين "تراكمات عديد السكاريد- عديد السكاريد"

الأنماط المصلية	Mw لـ PnPs ذو الحجم المحدد/ المعدل (ك دالتون) [SEC-]	PnPs المعدل المفعل (ك دالتون) [SEC-HP-RI]	الآثار

	[HP-RI		
6A	432	435	لا يوجد تراكم بين عديدات السكاريد المفعلة
6B	131	131	لا يوجد تراكم بين عديدات السكاريد المفعلة
19A	178	254 (بعد 20 دقيقة)	يوجد تراكم بين عديدات السكاريد المفعلة
		487 (بعد 60 دقيقة)	يوجد تراكم بين عديدات السكاريد المفعلة
		1173 (بعد 120 دقيقة)	يوجد تراكم بين عديدات السكاريد المفعلة
19F	157	205 (بعد 30 دقيقة)	يوجد تراكم بين عديدات السكاريد المفعلة

3) منع تحلل وتراكم PnPs ذات الحجم المحدد (19A و19F) بنسبة PnPs: CDAP بمقدار 1: 1.5 باستخدام خطوة الترشيح الثنائي:

للحد من هذا التراكم لـ 19A، تم تعريض PnPs المفعل لترشيح ثنائي بمقدار 10 ك دالتون باستخدام 2 مولار من NaCl لإزالة DMAP المتكون من المحلول قبل الترافق مع CRM197. ارجع إلى الأشكال 3 هـ (الترافق بدون 10 ك دالتون DF) و3و (الترافق مع 10 ك دالتون DF) حيث يتبين مستوى SEC-HP-RI للمترافق باستخدام PnPs المفعل والمرشح ثنائيًا بمقدار 10 ك دالتون و CRM197. إلا أن خطوة الترشيح الثنائي أثرت سلبًا على ناتج الترافق حيث أدت إلى انخفاض بمقدار 30%-40% في الناتج الكلي.

4) منع تحلل وتراكم PnPs ذات الحجم المحدد (19A و19F) بتقليل نسبة CDAP: PnPs إلى 1: 1 (19A) و1: 0.8 (19F) بدون الاستعانة بخطوة الترشيح الثنائي

تمت معالجة PnPs بالحجم المحدد في محلول التفاعل بـ CDAP بنسب 1: 1 و1 :0.8 فيما يتعلق بـ 19A و19F بالترتيب والتحقق من مستوى التحلل والتراكم ذو الصلة بواسطة SEC-HP-RI.

النتائج:

تبين أن نسب Ps:CDAP المعدلة (1: 1 فيما يتعلق بـ 19A و1: 0.8 فيما يتعلق بـ 19F) تمنع التحلل والتراكم لكل من 19A و19F PnPs. ارجع إلى الشكلين 3 (ز وح لـ 19A) و4 (ج ود لـ 19F). ثمة ميزة إضافية لاستخدام النسب المعدلة تتمثل في عدم الاستعانة بخطوة الترشيح الثنائي بمقدار 10 ك دالتون بما يضمن الحد الأدنى من فقدان الناتج الإجمالي.

تم ملاحظة أنه في حالة النمط المصلي 19Aserotype، عندما كانت "مدة تفعيل CDAP" أكبر من 10 دقائق، أدى ذلك إلى وجود ترابط تشابكي لعديد السكاريد المفعل مع عديد السكاريد المفعل بما يؤدي في النهاية إلى تكون "تراكمات عديد سكاريد- عديد سكاريد".

بالإضافة إلى ذلك، في حالة النمط المصلي 19Fserotype، عندما كانت "مدة تفعيلCDAP" أكبر من 20 دقيقة، فإن هذا أدى إلى الترابط التشابكي لعديد السكاريد المفعل مع عديد السكاريد المفعل بما يؤدي في النهاية إلى تكون "تراكمات عديد سكاريد- عديد سكاريد". فضلًا عن ذلك، تبين أن مدة تفاعل الترافق أكبر من المدة اللازمة للترابط التشابكي لعديد السكاريد المفعل مع عديد السكاريد المفعل بما يؤدي إلى تكون التراكمات. ارجع إلى الشكلين 3 و4.

ولكن فيما يتعلق بأنماط مصلية أخرى مثل 6APnPs و6BPnPs، لم تتم ملاحظة هذا الترابط التشابكي.

المثال 11:

تحضير المترافقات conjugates: PnPs19A و PnPs19F

تم إجراء ترافق عديد السكاريد إلى بروتين ناقل باستخدام طريقة الترافق CDAP لليس وآخرين (اللقاح 26: 190-198، 1996) مع إدخال التعديلات التالية:

1) لتحضير مترافق 19A، استخدم نسبة عديد السكاريد إلى CDAP بمقدار 1:1 عند 22o م مع مدة تفعيل بمقدار 4 دقائق وباستخدام نسبة عديد السكاريد إلى البروتين بمقدار 1:1

2) لتحضير مترافق 19F، استخدم نسبة عديد السكاريد إلى CDAP بمقدار 0.8:1 عند 22o م مع مدة تفعيل تتراوح من 9 إلى 10 دقائق وباستخدام نسبة عديد السكاريد إلى البروتين بمقدار 1:1 فيما يتعلق بـ 19F.

الجدول 10- مقارنة نتائج المترافقات conjugates فيما يتعلق بـ 19A و19F باتباع "طريقة ترافقCDAP التقليدية" (الخانة 1) و"طريقة الترافق المُحسنة" (الخانة 2).

1) بيانات تفاعل الترافق				
المترافقات conjugates	المترافق 19A		المترافق 19F	
رقم الدفعة	الخانة 1	الخانة 2	الخانة 1	الخانة 2
تركيز PnPs (ملجم/مل)	9.5	9.5	9.5	9.5
حل PnPs	2 مولار من NaCl	2 مولار من NaCl	2 مولار من NaCl	2 مولار من NaCl
وقت التفعيل (دقيقة)	4	4	4	9 إلى 10
نسبة PnPs/CDAP	1.0:1.5	1.0:1.0	1.0:1.5	1.0:0.8
تركيز CRM (ملجم/	20	20	20	20

مل)				
النسبة الأولية لـ Ps/CRM197	1.0:1.5	1.0:1.0	1.0:1.5	1.0:1.0
pHa:pHc:pHq	9.0:9.0:9.0	9.0:9.0:9.0	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5

2) خصائص المترافقات conjugates النهائية

المترافقات conjugates	المترافق 19A		المترافق 19F	
رقم الدفعة	الخانة 1	الخانة 2	الخانة 1	الخانة 2
النسبة النهائية لـ PnPs/CRM197	0.53	0.86	0.52	0.96
CRM197/PnPs	1.88	1.16	1.92	1.04
PnPs الحر (%)	1.9	1.5	1.7	1.07
CRM197 الحر (%)	ND	ND	ND	2.2
متوسط الحجم الجزيئي (SEC-HP-I)(ك دالتون)	1081	853	994	847
متوسط الحجم الجزيئي (UV/RI/MALS) (ك دالتون)	8212	6012	6393	4773

النتائج:

تم ملاحظة أن نسبة عديد السكاريد:CDAP المعدلة، ووقت تفعيل CDAP ونسبة عديد السكاريد:البروتين النهائية، تحد من تحلل عديد السكاريد محدد الحجم بواسطة 4-ثنائي ميثيل الأمين- بيريدين أثناء التفعيل وتمنع أيضًا تراكم عديد السكاريد- عديد السكاريد فيما بعد بما يحسن من خصائص المترافقات conjugates النهائية فيما يتعلق بالمحتوى الخالي من عديد السكاريد.

أدت طريقة الترافق المُحسنة المستخدمة في تحضير مترافقات A 19 conjugates و19F إلى إنتاج مترافقات conjugates لم تبين أي إشارة إستير أحادي من الفوسفات في مستويات المترافقات conjugates ذات الصلة (31P Proton NMR) بما يشير إلى أن طريقة الترافق المُحسنة تتسم بالفاعلية في تحسين التحلل المائي لعديدات السكاريد على مستوى تفاعلات الترافق.

في ضوء العديد من النماذج المحتملة التي تنطبق عليها مبادئ الافصاح المفصح عنه، يجب إدراك أن الجانب المبينة هي مجرد أمثلة مفضلة مقدمة على الافصاح ولا يجب اعتبارها مقيدة لنطاق الافصاح. كما لا يتم تحديد نطاق الافصاح إلا من خلال عناصر الحماية التالية. وبناًء عليه، فإنني ندعي افصاحنا بأنه عبارة عن جميع ما يدخل ضمن روح عناصر الحماية المبينة ونطاقها.

عناصر الحماية

١. طريقة لتحضير لقاح مرافق بروتين المكورة الرئوية متعددة السكاريد stable multivalent Streptococcus pneumoniae polysaccharide–protein conjugate vaccine، تظهر امتزاز مثالي لكل مرافق وأقل تكتل للمترافقات ، الطريقة المذكورة تشمل الخطوات التالية:

أ. ترافق جزيئات عديد السكاريد للمكورة الرئوية المشتقة من المكورات الرئوية إلى مادة حاملة لبروتين بنسبة تتراوح بين 0.5 و1.4؛ وعند رقم هيدروجيني يتراوح بين 5.2 و5.9 للحصول على مترافقات عديد سكاريد – بروتين؛

ب. بصورة فردية امتزاز مترافقات عديد سكاريد – بروتين تم الحصول عليها في الخطوة (أ) تشتمل على الأنماط الفردية A6، V9 و٢٣F على مساعد ملح ألمنيوم أول في محلول منظم من هيستيدين – حمض سكسينيك بتركيز يتراوح بين 1 ملي مولار و200 ملي مولار وعند رقم هيدروجيني يتراوح بين 5.6 و5.8، حيث تتراوح كمية مساعد ملح الألمنيوم المذكور من 20–375 ميكرو جرام من +++Al لكل جرعة تبلغ 0.5 مل تركيبة اللقاح النهائية؛

ت. خلط وامتزاز مترافقات عديد سكاريد – بروتين التي تم الحصول عليها في الخطوة (1) تشتمل على الأنماط الفردية التي تُختار من 1، 2، 3، 4، 5، B6، F7، F12، 14، B15، C18، A19، F19، وF22 على مساعد ملح ألمنيوم ثاني في محلول منظم من هيستيدين – حمض سكسينيك بتركيز يتراوح بين 1 ملي مولار و200 ملي مولار وتحول في الرقم الهيدروجيني من 6.8 إلى ما يتراوح بين 5.6 و5.8، حيث تتراوح كمية مساعد ملح الألمنيوم المذكور من 20–375 ميكرو جرام من +++Al لكل جرعة تبلغ 0.5 من تركيبة اللقاح النهائية؛ و

ث. مزج المجموعة الممتزة الأولى المذكورة التي تم الحصول عليها في الخطوة (2) مع المجموعة الممتزة الثانية التي تم الحصول عليها في الخطوة (3)، في وجود خافض توتر سطحي بمساعدة دفاعة توربينية بنصل مسطح Rushton للحصول على تركيبة لقاح مترافق عديد سكاريد وبروتين للمكورة الرئوية متعددة التكافؤ مستقرة،

حيث يتم اختيار البروتين من CRM١٩٧ و وذوفان الكُراز tetanus (TT) و ذوفان الخُناق diphtheria (DT) يتم تحضير مترافقات عديد سكاريد وبروتين للمكورات الرئوية باستخدام كيمياء ترافق بادخال سيانيل ويتراوح الامتزاز من 75–99%، كما تم قياسه بواسطة ELISA بيني.

2- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية رقم 1، حيث تشتمل الخطوة (أ) على:

أ. تفاعل عديد سكاريد المكورات الرئوية pneumococcal polysaccharide التي تحتوي على رابطة فوسفو داي إستر phosphodiester linkage بين وحدات تكرار مرتبطة تساهمياً ببروتين حامل يتسم بمتوسط حجم يتراوح بين 130 كيلو دالتون و190 كيلو دالتون مع عامل إدخال سيانيل cyanylation agent بنسبة ١:٠,٨ و1:1 عند 22° م إلى 25° م لفترة تتراوح بين 4 دقيقة إلى 10 دقائق، مما يؤدي إلى عديد سكاريد منشط بسيانات cyanate-activated polysaccharide؛

ب. ملامسة عديد سكاريد منشط بسيانات cyanate-activated polysaccharide مع بروتين بنسبة تبلغ 1:1 عند رقم هيدروجيني يتراوح من 9 إلى 9.5 لفترة تتراوح من 3 ساعات إلى 5 ساعات متبوعة بالإخماد بجليسين glycine؛

حيث تعمل عملية الترافق المذكورة على تقليل التحلل بواسطة منتج ثانوي لعامل إدخال سيانيل cyanylation agent لعديد سكاريد تم ضبط حجمه وتمنع تكتل لاحق لعديد سكاريد-عديد سكاريد polysaccharide-polysaccharide، مما يؤدي إلى مترافق به أدنى محتوى من عديد سكاريد حر.

3- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية رقم 2، حيث يتم اشتقاق عديد السكاريد الذي يشتمل على رابطة فوسفو داي إستر phosphodiester linkage بين وحدات تكرار من أحد الأنماط المصلية للمكورات الرئوية streptococcus pneumoniae serotype A19، F19، A6 أو B6.

4- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية رقم 3، حيث يكون عديد السكاريد من النمط المصلي لعديد سكاريد للمكورات الرئوية streptococcus pneumoniae serotype A19 ويكون عامل إدخال سيانيل عبارة عن 1- سيانو- 4- داي ميثيل - أمينو- بيريميدنيوم - تترا فلورو بورات 1-cyano-4-dimethyl-amino-pyridinium-tetrafluoroborate مختلط بنسبة 1:1 عند 22° م لفترة تبلغ 4 دقائق مما يؤدي إلى عديد سكاريد منشط بسيانات cyanate-activated polysaccharide.

5- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية رقم 3، حيث يكون عديد السكاريد من النمط المصلي لعديد سكاريد للمكورات الرئوية Streptococcus pneumoniae serotype F19 ويكون عامل إدخال سيانيل عبارة عن 1- سيانو- 4- داي ميثيل - أمينو- بيريميدنيوم - تترا فلورو بورات 1- cyano-4-dimethyl-amino-pyridinium-tetrafluoroborate مختلط بنسبة ١:٠,٨ عند 22 ° م لفترة تبلغ 8-10 دقائق مما يؤدي إلى عديد سكاريد منشط بسيانات cyanate-activated polysaccharide.

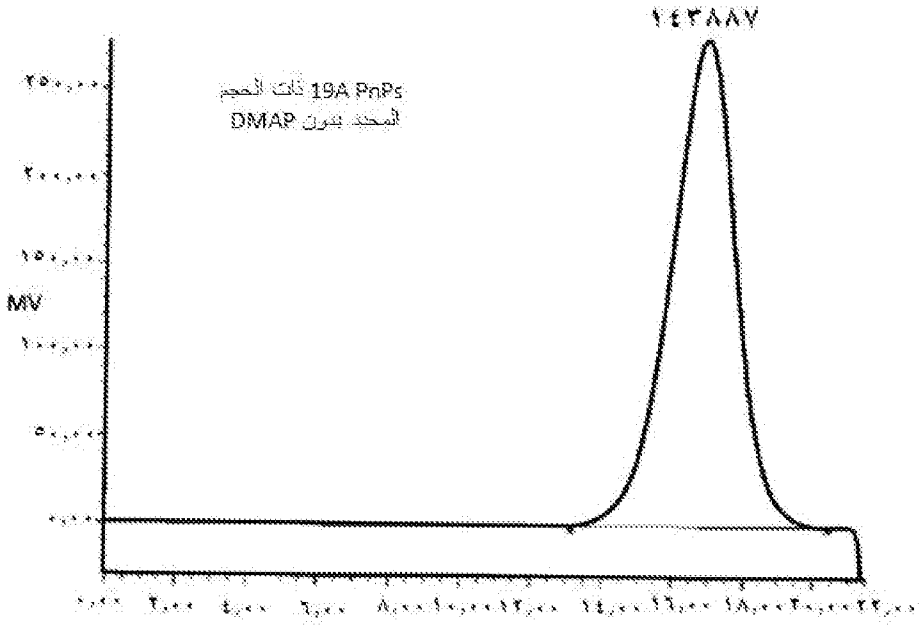
6- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية رقم 1، حيث يتسم المحلول المنظم بهيستيدين - حمض سكسينيك histidine-succinic acid buffer المذكور بتركيز يتراوح بين 1 ملي مولار و 200 ملي مولار.

7- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية رقم 6، حيث يتسم المحلول المنظم بهيستيدين - حمض سكسينيك histidine-succinic acid buffer المذكور بتركيز يتراوح بين 10 ملي مولار و 40 ملي مولار.

8- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية رقم ٧، حيث يترافق النمط المصلي 3 مع CRM197، يترافق النمط المصلي C18 مع CRM197، يترافق النمط المصلي 4 مع DT، يترافق النمط المصلي B15 مع TT، ويترافق النمط المصلي F22 مع TT.

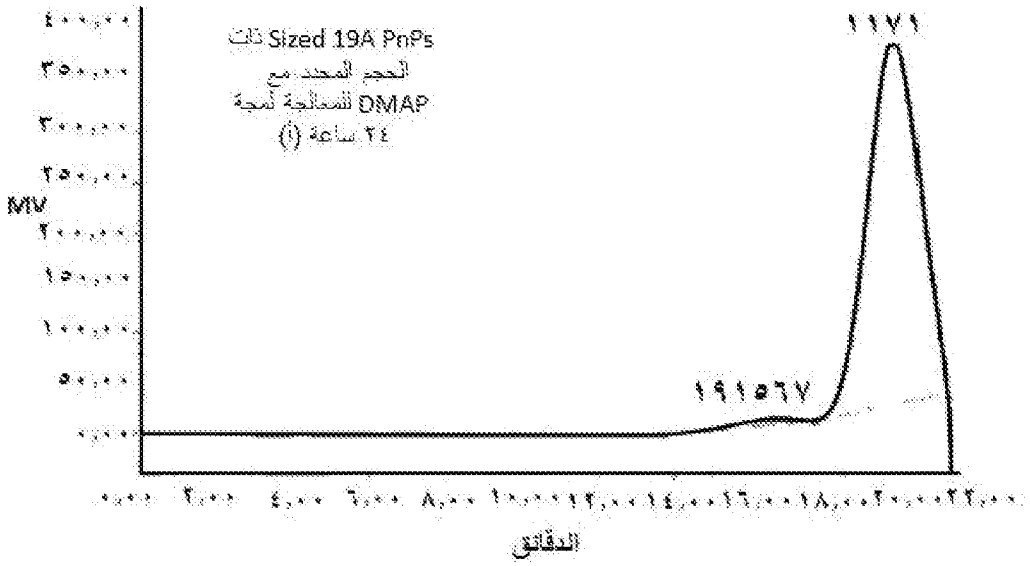
شكل ١

	اسم القمة	درجة الحرارة	المساحة	الأقصى (بالثون)	الأدنى (بالثون)	MP (بالثون)	المساحة %	التقنت المتحد
١	القمة ٤	١٦,٨٨١	٣٦٠٥٠٠١٠	١٠٨٣٥٧	١٢٤٣٠٥	١٤٣٨٨٧	١٠٠,٠٠	١,٤٣٤٠٢٥



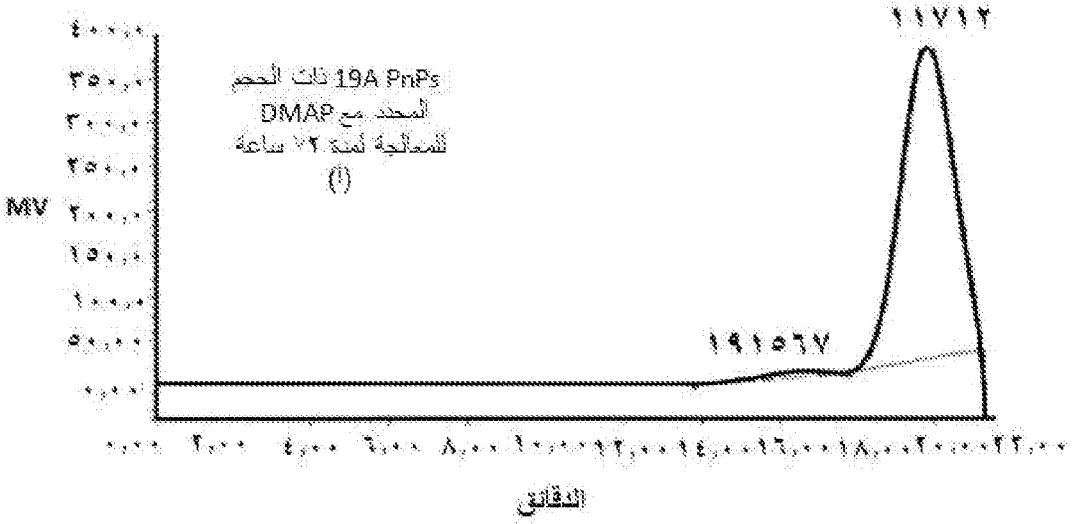
شكل ١٢أ

	اسم القمة	حرارة الغرفة	المساحة	الأقصى (دالتون)	الأدنى (دالتون)	MP (دالتون)	المساحة %	الكتلة المقيد
١	القمة ٨	١٨,١٢٠	١٦٨٢١٣٤٤	٦٩٩٤١	٣٧١٠٥	٦١٦٥٠	١٠٠,٠٠	١,٨٨٤٩٥٩



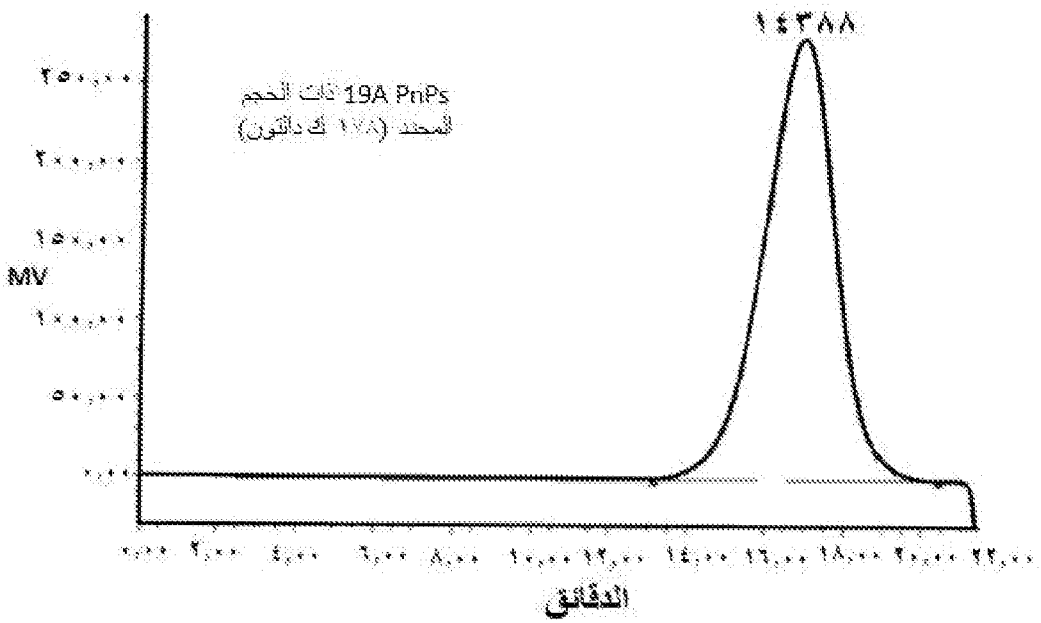
شكل ٢ب

	اسم القمة	درجة الحرارة	المساحة	الأقصى (دالتون)	الأدنى (دالتون)	MP (دالتون)	المساحة %	التشتت المتحد
١	البطاق	١٦,٤١٧	٥٦١٣١٧	٢٢٤٠٣٠	١٩٤١٠٨	١٩١٥٨٧	١,٦٢	١,١٥٤١٨١
٢	القمة ٩	١٩,٨٧٥	٣٤١٤٠٧٨٠	١٤٤٨٧	٩٠٠٧	١١٧١٢	٩٨,٣٨	١,٦٠٦٣٧٨



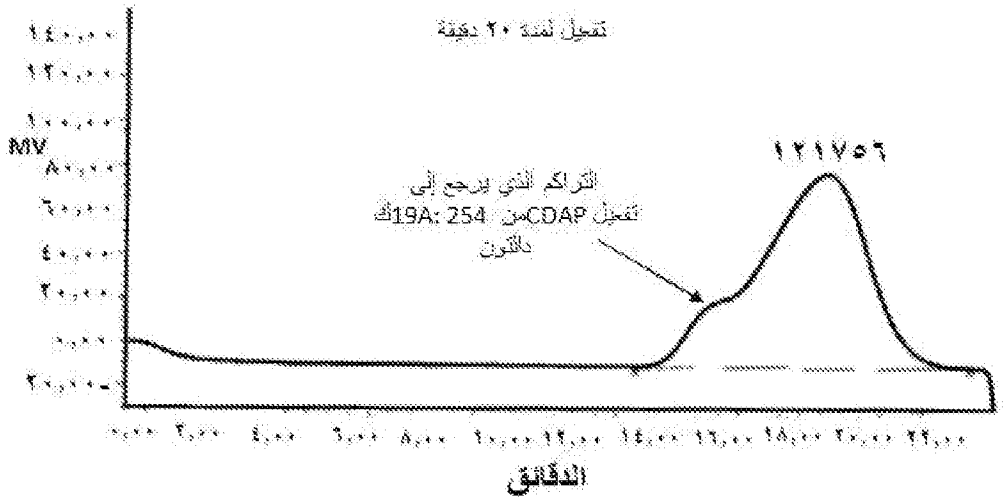
شكل ١٣أ

	اسم القمة	حرارة الذروة	المساحة	الأقصى (دالتون)	الأدنى (دالتون)	MP (دالتون)	المساحة %	التقنت المتحد
١	القمة ٤	١٦,٨٨١	٣٦٠٥٠٠١٠	١٧٠٣٥٧	١٢٤٣٠٥	١٤٣٨٨٧	١٠٠,٠٠	١,٤٣٤٠٢٥

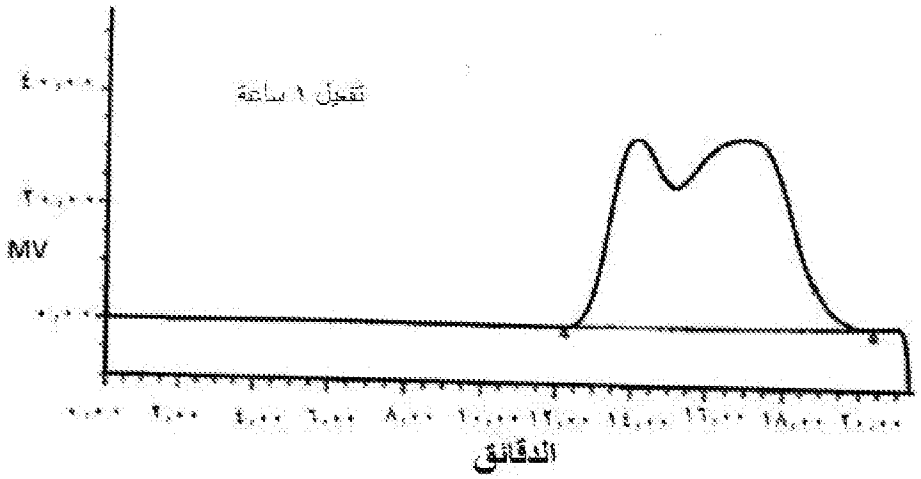


شكل ٣ب

	اسم القمة	حرارة الغرفة	المساحة	الأقصى (دالتون)	الأدنى (دالتون)	MP (دالتون)	المساحة %	التفتت المتحد
١	القمة ٤	٢٠,١٤٤	١٦٨٨٢٤٤٦	٢٥٤٢٢٩	١١٤٧٩١	١٢١٧٥٦	١٠٠,٠٠	٢,٢١٤,٣٨

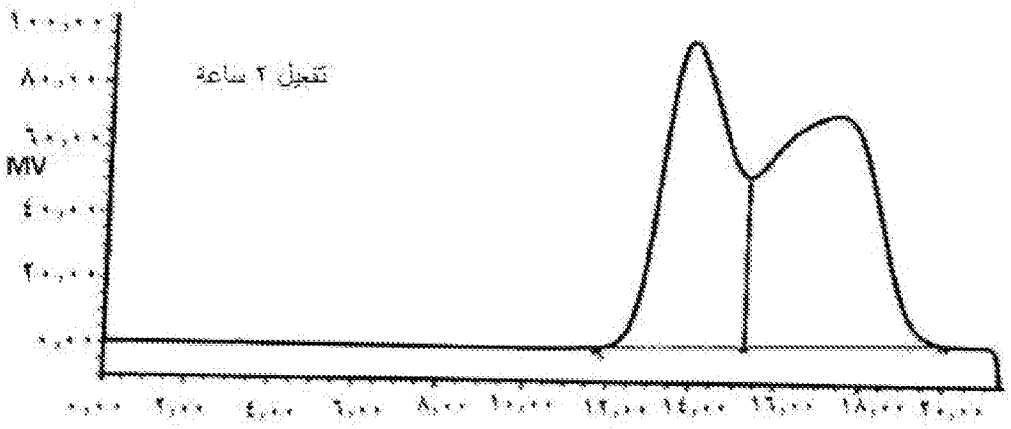


الشكل ٣ج



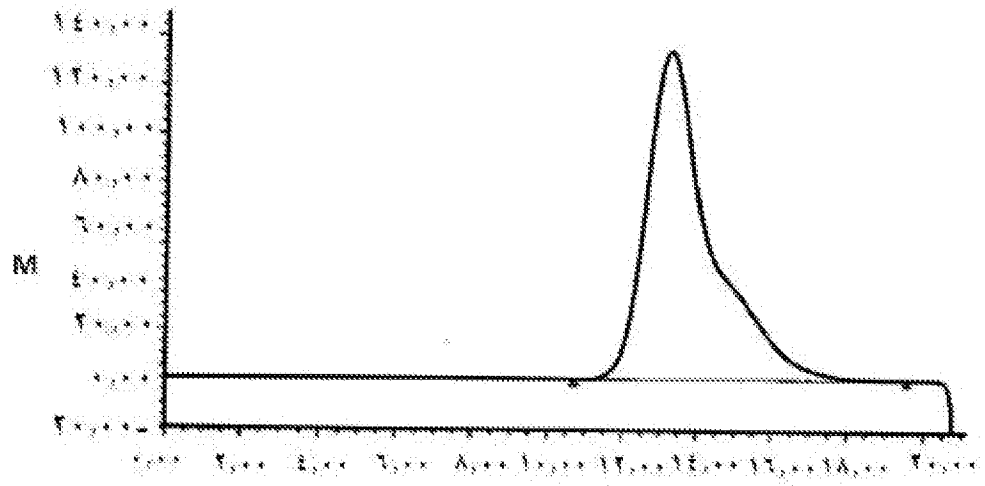
	اسم العينة	حرارة الذروة	المساحة	الأكسو (بالكرن)	الأدنى (بالكرن)	MW (بالكرن)	المساحة %	الكتلة المقدرة
١	الاطاق	٢٤،١٢٣	٩٤٤٢٧٠٩	٤٨٠٣٩٦٧	١٧٢٢٠٦	٩٦١٧٤٥	١٠٠،٠٠	٢،٤٢٩٥٥٩

الشكل ٣د



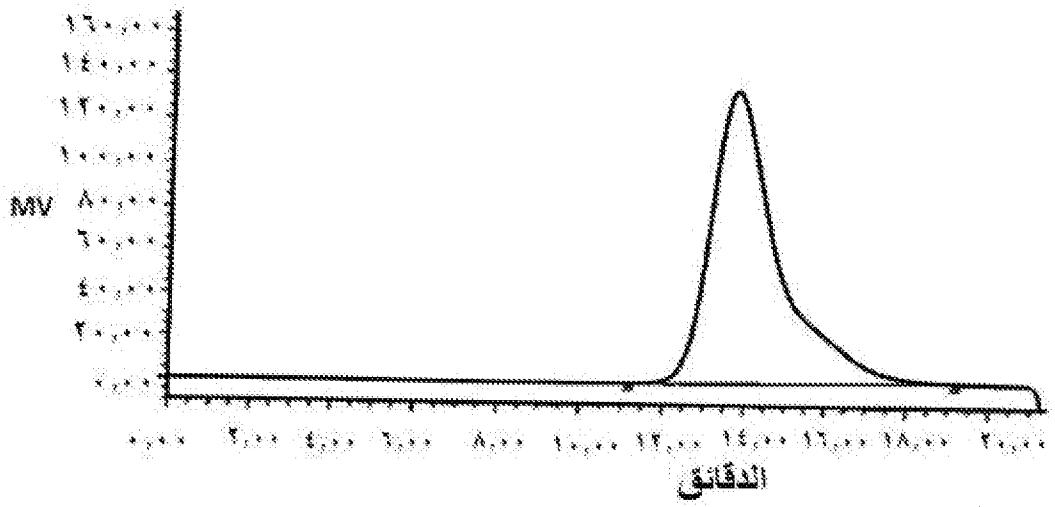
	اسم العينة	حرارة الغرفة	المساحة	الأقصى (دالتون)	الأدنى (دالتون)	MP (دالتون)	المساحة %	الكتلة الجزيئية
١	القطاق	٢٣,٨٦٠	١٠٢٨٩٢٠٨	١١٧٣٥٢١	٩٦١٢٠٦	١١٥٠١١١	٤٤,٧٠	١,٢٨٧٨٧٣
٢	القمة ٤	٢٣,٣٧٣	١٢٠٣١٣٠٥	١٧٣٨٤٦	١١٤٩٦٤	٢١٧٢٥٠	٥٥,٣٠	١,٥١٢٨٧٣

الشكل ٣هـ



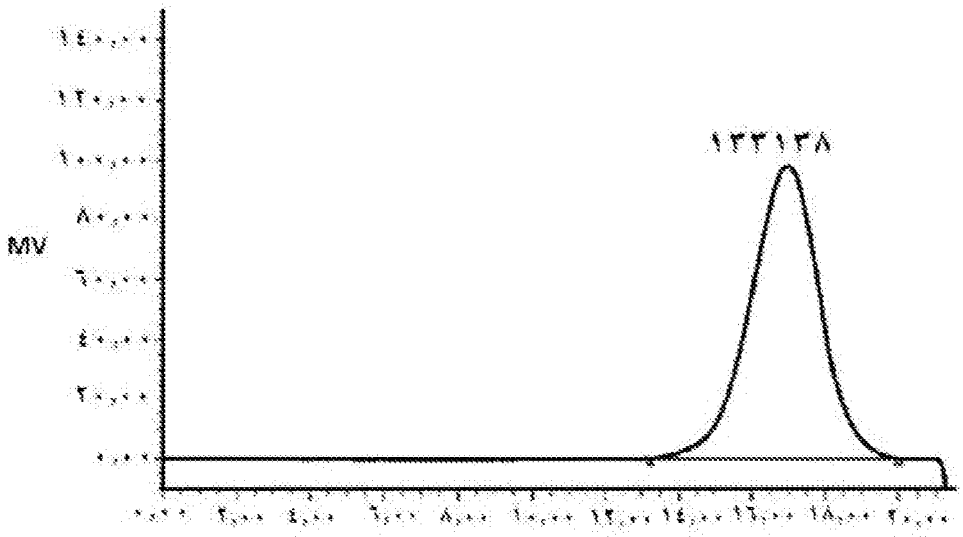
	اسم القمة	حرارة الغرفة	المساحة	الأقصى (دالتون)	الأدنى (دالتون)	MP (دالتون)	المساحة %	التشتت المقدر
١	التطابق	١٣,٢٤٣	١٦١٢٠٣٩٦	٨٩٨٤٦٤	٤٩٩٩٢٣	١٠٠٨٨٠١	١٠٠,٠٠	١,٢٩٧٢٠٣

الشكل ٣و



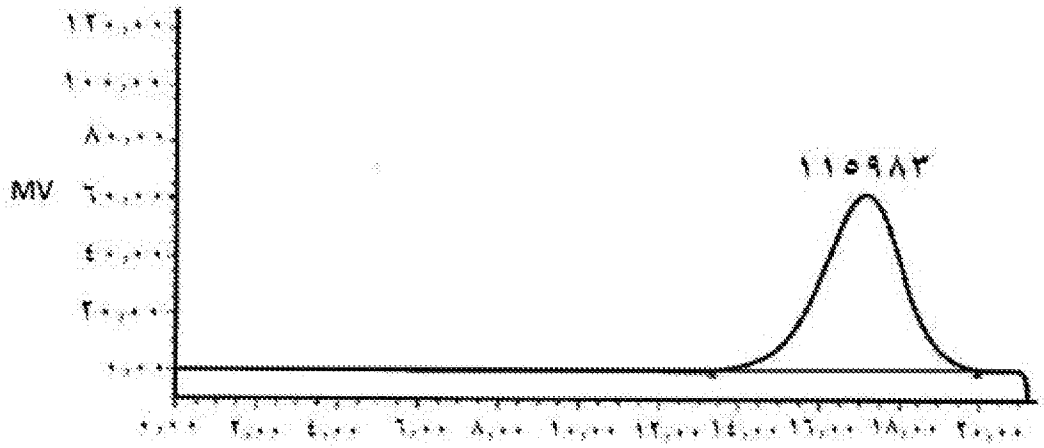
	اسم القمة	حرارة الغرفة	المساحة	الأقصى (دالتون)	الأدنى (دالتون)	MP (دالتون)	المساحة %
١	النطاق	١٣٠٧٢٩	١٥٤٨٧٢٦٠	١٠٩٨٧٥٧	٦١٩٢٧١	١١٨٩٦١٧	١٠٠,٠٠

الشكل ٣ز



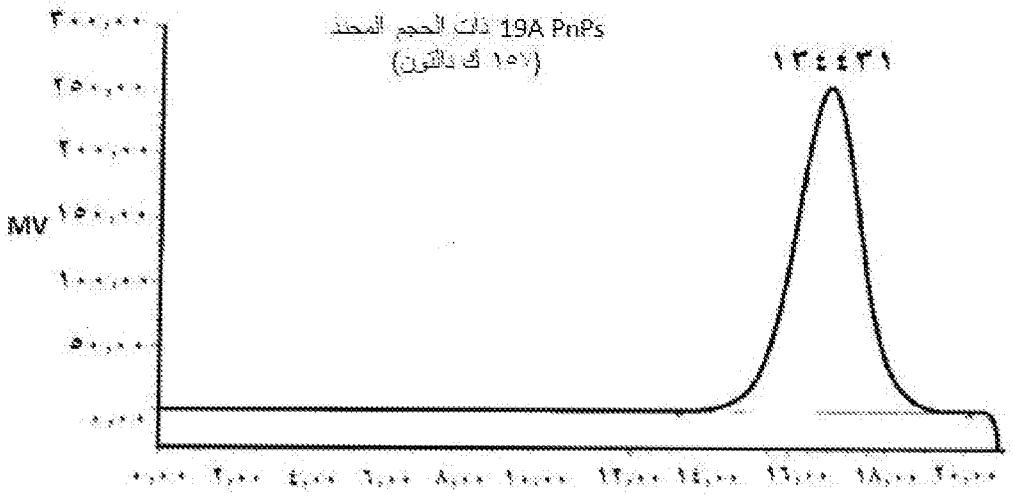
	اسم القمة	حرارة الغرفة	المساحة	الأقصى (دالتون)	الأدنى (دالتون)	MP (دالتون)	المساحة %	التركيز المعتمد
١	القمة ٤	١٦,٩٨٠	١٢٩٣٩١٤٦	١٦٦٨٠٧	١١٣٧٧٠	١٣٣١٣٦	١٠٠,٠٠	١,٤٦٧٠٥٠

الشكل ٣ح



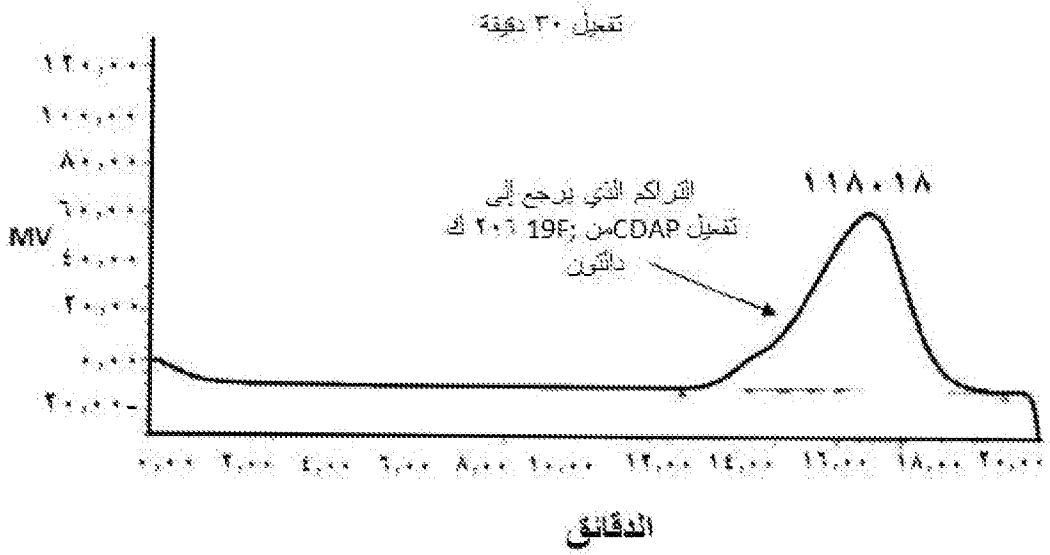
	اسم القمة	حرارة الغرفة	المساحة	الأقصى (بالنون)	الأدنى (بالنون)	MP (بالنون)	المساحة %	التشتت المتحد
١	القمة ٤	١٧,١٩٢	٨٨٨٤٤٦٨	١٥٦٢٣٩	٩٩٤٩٧	١١٥٩٨٣	١٠٠,٠٠	١,٥٧٠٢٩٣

الشكل ١٤أ

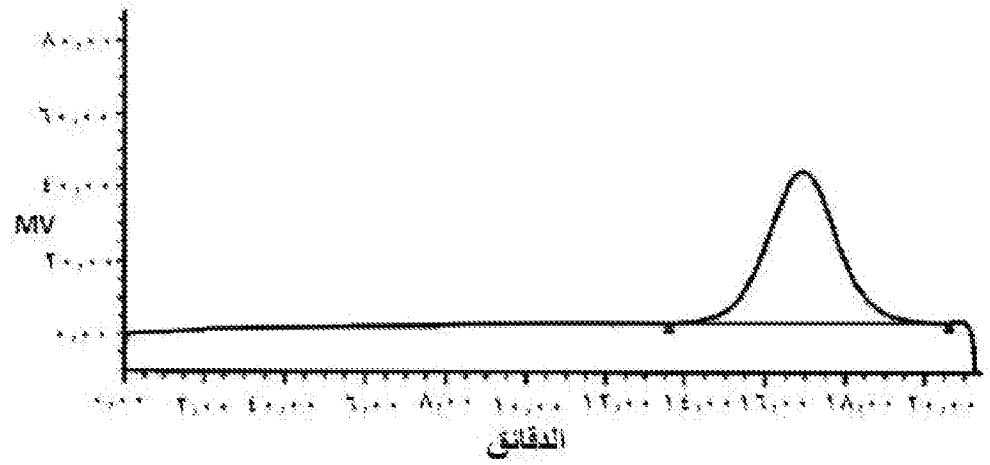


	اسم القمة	حرارة الغرفة	المساحة	الأقصى (دالتون)	الأدنى (دالتون)	MP (دالتون)	المساحة %	التشتت المتحد
١	القمة ٤	١٦,٩٠٩	٣٠٢٥٦٢١١	١٥٧٥٥٣	١١٤٤١٣	١٣٤٤٣١	١٠٠,٠٠	١,٣٧٠٥٤

الشكل ٤ب

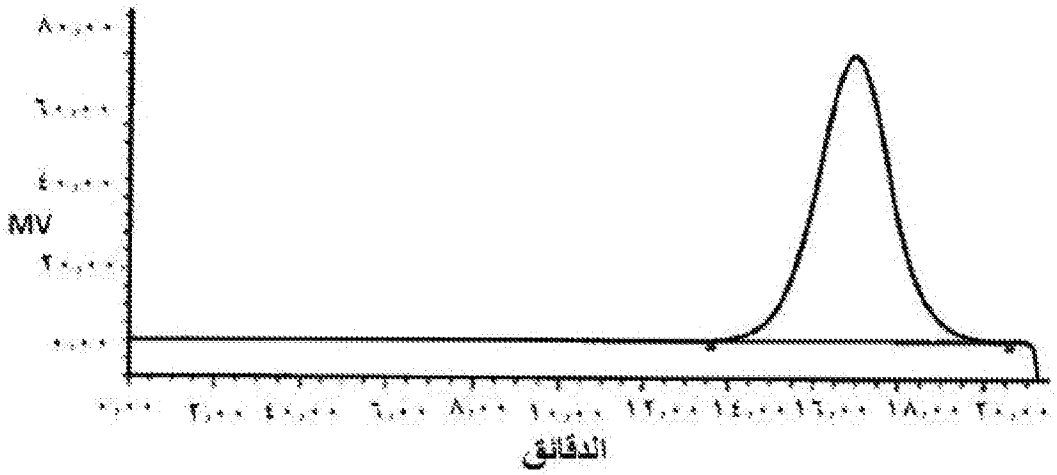

تسجيل ٣٠ دقيقة
١٢٠,٠٠
١٠٠,٠٠
٨٠,٠٠
٦٠,٠٠
MV
٤٠,٠٠
٢٠,٠٠
٠,٠٠
٢٠,٠٠-
١١٨٠١٨
التراكم الذي يرجع إلى
تسجيل CDAPمن 19F; ٢٠٦ ك
دالتون
٠,٠٠ ٢,٠٠ ٤,٠٠ ٦,٠٠ ٨,٠٠ ١٠,٠٠ ١٢,٠٠ ١٤,٠٠ ١٦,٠٠ ١٨,٠٠ ٢٠,٠٠
الدقائق

الشكل ٤ ج



	اسم القمة	حزارة الغرفة	المساحة	الأقصى (دالتون)	الأدنى (دالتون)	MP (دالتون)	المساحة %	التشتت المتحد
١	القمة ٤	١٦,٩٤٠	٥٠٨١٥٢٥	١٦١٢٥٥	١١٦٠٠٧	١٤١٩٢٢	١٠٠,٠٠	١,٣٩٠٠١٠

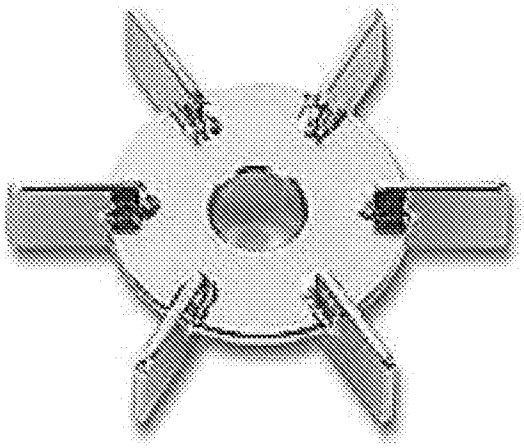
الشكل ٤د



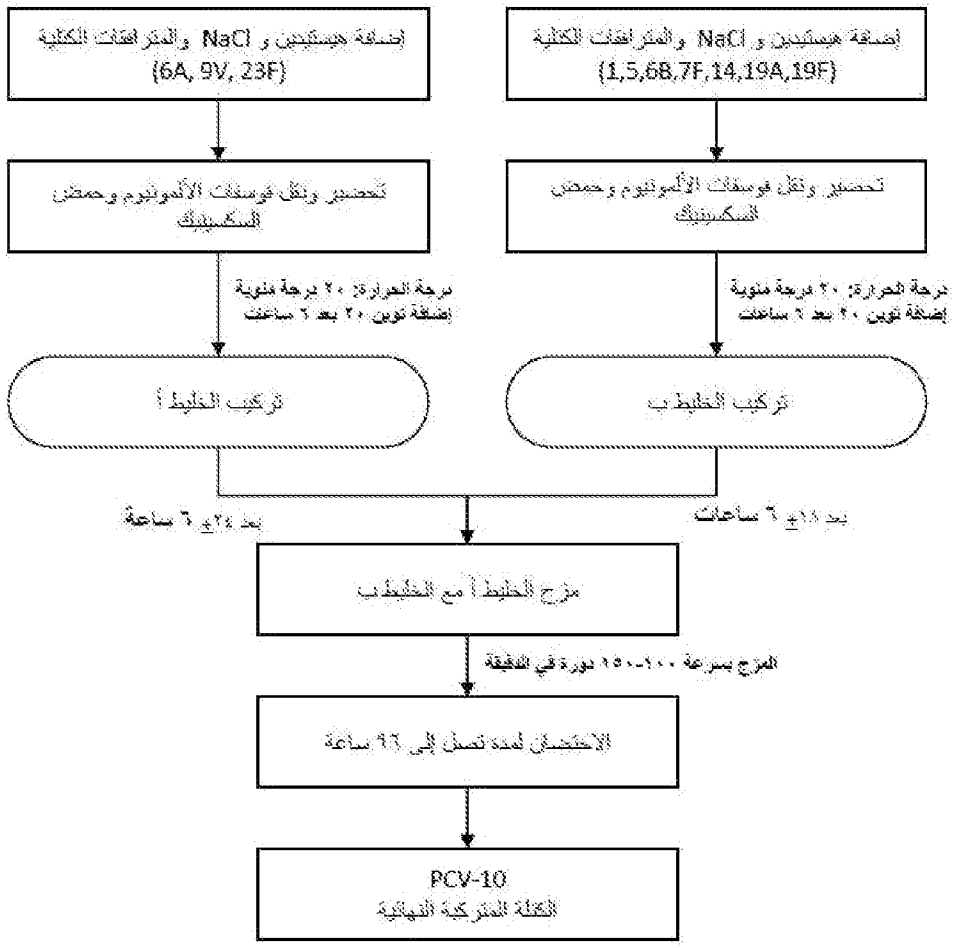
	اسم القمة	حرارة الغرفة	المساحة	الأقصى (دالتون)	الأدنى (دالتون)	MP (دالتون)	المساحة %	التشتت المتحد
١	القمة ٤	١٦,٩٥٢	٩٩٢١١٣٨	١٦١٣٦٠	١١٤٤٣٠	١٤٠٨٤٧	١٠٠,٠٠	١,٤١٠,٩١٢

الشكل ٥

دافع توربيني من نوع Rushton مزود بستة أنصال مسطحة



الشكل ٦


إضافة هيستيدين و NaCl والمترافقات الكتلية (1,5,6B,7F,14,19A,19F)
إضافة هيستيدين و NaCl والمترافقات الكتلية (6A, 9V, 23F)
تحضير ونقل فوسفات الألمونيوم وحمض السكسينيك
تحضير ونقل فوسفات الألمونيوم وحمض السكسينيك
درجة الحرارة: ٢٠ درجة مئوية
إضافة توين ٢٠ بعد ٦ ساعات
درجة الحرارة: ٢٠ درجة مئوية
إضافة توين ٢٠ بعد ٦ ساعات
تركيب الخليط ب
تركيب الخليط أ
بعد ١٨ إلى ٢٦ ساعة
بعد ٢٤ إلى ٦ ساعة
مزج الخليط أ مع الخليط ب
المزج بسرعة ١٠٠-١٥٠ دورة في الدقيقة
الاحتضان لمدة تصل إلى ٩٦ ساعة
PCV-10
الكتلة المتركبة النهائية

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشـرط تسـديد المقابل المالي السـنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سـقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية.

صادرة عن

الهيئة السعودية للملكية الفكرية

ص ب ٦٥٣١ ، الرياض ١٣٣٢١ ، المملكة العربية السعودية

SAIP@SAIP.GOV.SA