

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 834**

51 Int. Cl.:
A61K 39/09 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/34 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07874358 .0**
96 Fecha de presentación: **10.12.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2094298**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54 Título: **Composición multivalente de conjugados de polisacárido neumocócico-proteína**

30 Prioridad:
22.12.2006 US 644924

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.05.2012

73 Titular/es:
**WYETH LLC
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:
**HAUSDORFF, William P.;
SIBER, George Rainer;
PARADISO, Peter R. y
PRASAD, A. Krishna**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 379 834 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición multivalente de conjugados de polisacárido neumocócico-proteína

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al campo de la medicina, y específicamente al de la microbiología, inmunología, vacunas y a la prevención, por inmunización, de infecciones ocasionadas por un patógeno bacteriano.

Antecedentes de la invención

10 *Streptococcus pneumoniae* es una causa principal de meningitis, neumonía y enfermedades invasivas graves en bebés y en niños pequeños en todo el mundo. Las vacunas de polisacáridos neumocócicos multivalentes se han autorizado durante muchos años y han demostrado ser valiosas en la prevención de enfermedades neumocócicas en adultos de edad avanzada y en pacientes de alto riesgo. Sin embargo, los bebés y los niños pequeños responden mal a la mayoría de los polisacáridos neumocócicos. La vacuna conjugada neumocócica 7-valente (7vPnC, Pevnar®) fue la primera de este tipo que demostró ser altamente inmunogénica y eficaz contra enfermedades invasivas y otitis media en bebés y en niños pequeños. Actualmente esta vacuna está autorizada en muchos países en todo el mundo. Pevnar contiene los polisacáridos capsulares de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19C y 23F, cada uno conjugado con una proteína transportadora denominada CRM₁₉₇. Pevnar protege aproximadamente el 80-90%, 60-80% y 40%-80% de las enfermedades neumocócicas invasivas (ENI) en los Estados Unidos, Europa y otras regiones del mundo, respectivamente [1,2]. Como se esperaba, datos de observaciones recogidos durante los años posteriores a la introducción de Pevnar han demostrado claramente una reducción de enfermedades neumocócicas invasivas en bebés en los Estados Unidos (FIG. 1) [3,4].

20 La observación de ENI realizada en bebés en los Estados Unidos antes de la introducción de Pevnar demostró que una parte significativa de enfermedades debidas a los serogrupos 6 y 19 se debía a los serotipos 6A (aproximadamente una tercera parte) y 19A (aproximadamente una cuarta parte) [5,6]. La observación de enfermedades neumocócicas invasivas realizada en los Estados Unidos después de obtener la licencia de Pevnar sugiere que una gran carga de enfermedad todavía puede atribuirse a los serotipos 6A y 19A (FIG. 1) [3]. Además, estos dos serotipos representan más casos de enfermedades invasivas que los serotipos 1, 3, 5 y 7F, combinados (8.2 frente a 3,3 casos/100.000 niños de 2 años y menores). Además, los serotipos 6A y 19A están asociados con altos índices de resistencia a antibióticos (FIG. 2) [7, 8, 9]. Aunque a medida que se inmunizan más niños es posible que la protección cruzada de serogrupos de cómo resultado una disminución de enfermedades ocasionadas por los serotipos 6A y 19A, existen pruebas que sugieren que habrá un límite a la disminución, y que permanecerá una carga significativa de enfermedades debida a estos serotipos (véase más adelante).

35 Dada la carga relativa y la importancia de enfermedades neumocócicas invasivas debida a los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A, la adición de estos serotipos a la formulación de Pevnar aumentaría la protección para enfermedades invasivas a > 90% en los Estados Unidos y en Europa, y tan alta como 70%-80% en Asia y América Latina. Esta vacuna ampliaría significativamente la protección más allá de Pevnar, y para los serotipos 6A y 19A proporcionaría una protección que no sería dependiente de las limitaciones de la protección cruzada de serogrupos.

Los documentos WO 2006/110381 y US 2006228380 desvelan, entre otras cosas, un procedimiento para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 3 de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína transportadora que comprende una etapa de oxidación usando peryodato de sodio.

Sumario de la invención

40 La presente descripción proporciona en general una composición inmunogénica multivalente que comprende 13 conjugados distintos de polisacárido-proteína, en la que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* diferente conjugado con una proteína transportadora, junto con un vehículo fisiológicamente aceptable. Opcionalmente, en la formulación se incluye un adyuvante, tal como un adyuvante basado en aluminio. Más específicamente, la presente descripción proporciona una composición conjugada neumocócica 13-valente (13vPnC) que comprende los siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C y 23F) incluidos en la vacuna 7vPnC más seis serotipos adicionales (1, 3, 5, 6A, 7F y 19A).

La presente descripción también proporciona una composición inmunogénica multivalente, en la que los polisacáridos capsulares son de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A y 23F de *Streptococcus pneumoniae* y la proteína transportadora es CRM₁₉₇.

50 La presente descripción proporciona adicionalmente una composición inmunogénica multivalente, en la que los polisacáridos capsulares son de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A y 23F de *Streptococcus pneumoniae*, la proteína transportadora es CRM₁₉₇ y el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio, tal como fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización particular de la invención, el adyuvante es fosfato de aluminio.

55

La presente descripción también proporciona una composición inmunogénica multivalente, que comprende conjugados de polisacárido-proteína junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, en el que cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* diferente conjugado con una proteína transportadora, y los polisacáridos capsulares se preparan a partir del serotipo 3 y de al menos un serotipo adicional.

En una realización de esta composición inmunogénica multivalente, el serotipo adicional se selecciona del grupo que consiste en los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A y 23F. En otra realización, la proteína transportadora es CRM₁₉₇. En otra realización adicional, la composición comprende un adyuvante, tal como adyuvante basado en aluminio seleccionado de fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización particular el adyuvante es fosfato de aluminio

La presente descripción también proporciona una composición inmunogénica multivalente, que comprende conjugados de polisacárido-proteína junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, en el que cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* diferente conjugado con una proteína transportadora, y los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y de al menos un serotipo adicional.

En una realización de esta composición inmunogénica multivalente, el serotipo adicional se selecciona del grupo que consiste en los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A. En otra realización, la proteína transportadora es CRM₁₉₇. En otra realización adicional, la composición comprende un adyuvante, tal como un adyuvante basado en aluminio seleccionado de fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización particular, el adyuvante es fosfato de aluminio.

La presente descripción también proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra un conjugado de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, que comprende administrar a un ser humano una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas que acaban de describirse.

La presente descripción también proporciona que cualquiera de las composiciones inmunogénicas, administradas como una sola dosis de 0,5 ml, se formule para contener: 2 µg de cada sacárido, excepto para 6B que es de 4 µg; aproximadamente 29 µg de proteína transportadora CRM₁₉₇; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y tampón de cloruro de sodio y succinato de sodio como excipientes.

También se proporcionan procedimientos para fabricar un conjugado inmunogénico que comprende el polisacárido de serotipo 3 (Pn 3) de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína transportadora. En una realización, el procedimiento comprende (i) hacer reaccionar el polisacárido Pn 3 purificado con un ácido suave dando como resultado un polisacárido Pn 3 hidrolizado; (ii) hacer reaccionar el polisacárido Pn 3 hidrolizado con un agente oxidante en presencia de cationes bivalentes dando como resultado un polisacárido Pn 3 activado; (iii) combinar el polisacárido Pn 3 activado con una proteína transportadora; (iv) hacer reaccionar el polisacárido Pn 3 activado y la proteína transportadora combinados, con un agente reductor dando como resultado un conjugado de polisacárido Pn 3: proteína transportadora y (v) proteger los aldehídos que no han reaccionado en el conjugado de polisacárido Pn 3: proteína transportadora dando como resultado un conjugado inmunogénico que comprende el polisacárido Pn 3 de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína transportadora.

En una realización adicional, el procedimiento comprende (i) hacer reaccionar el polisacárido Pn 3 purificado con ácido acético dando como resultado un polisacárido Pn 3 hidrolizado; (ii) hacer reaccionar el polisacárido Pn 3 hidrolizado con un ácido peryódico en presencia de MgCl₂ dando como resultado un polisacárido Pn 3 activado; (iii) purificar el polisacárido Pn 3 activado; (iv) combinar el polisacárido Pn 3 activado con una proteína transportadora; (v) liofilizar conjuntamente el polisacárido Pn 3 activado y la proteína transportadora combinados; (vi) hacer reaccionar el polisacárido Pn 3 activado y la proteína transportadora, liofilizados conjuntamente, con cianoborohidruro de sodio dando como resultado un conjugado de polisacárido Pn 3: proteína transportadora y (vii) proteger con borohidruro de sodio los aldehídos que no han reaccionado en el conjugado de polisacárido Pn 3: proteína transportadora dando como resultado un conjugado inmunogénico que comprende el polisacárido Pn 3 de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína transportadora.

También se proporciona un procedimiento para fabricar un polisacárido Pn 3 de *Streptococcus pneumoniae* activado. El procedimiento comprende (i) hacer reaccionar el polisacárido Pn 3 purificado con un ácido suave dando como resultado un polisacárido Pn 3 hidrolizado; y (ii) hacer reaccionar el polisacárido Pn 3 hidrolizado con un agente oxidante en presencia de cationes bivalentes dando como resultado un polisacárido Pn 3 activado.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa los cambios en cuanto a los índices de ENI por serotipos en niños < de 2 años en los Estados Unidos desde el punto de partida (años 1998/1999) al año 2001.

La FIG. 2 representa la distribución de aislados neumocócicos con resistencia a penicilina (PCN) en niños < de 5 años (1998).

La FIG. 3 representa las curvas de distribución acumulativa inversa (CDAI) de resultados OPA (ensayo opsonofagocítico) después de tres dosis procedentes del experimento con Pevnar D118-P16.

Descripción detallada de la invención***Inclusión de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F en Prevnar***

Datos de observaciones ENI entre 1995-1998 calcularon que los siete serotipos en Prevnar eran responsables de aproximadamente el 82% de ENI en niños < 2 años [5]. En el norte de California, el lugar donde se realizó el estudio de eficacia, los serotipos de Prevnar representaron el 90% de todos los casos de ENI en bebés y niños pequeños [10]. Desde la introducción de la vacuna Prevnar en el año 2000, ha habido una disminución significativa en los índices de ENI globales a causa de una disminución en la enfermedad debido a los serotipos de la vacuna [3,4]. Por lo tanto, en este momento no existe justificación para eliminar ninguno de los serotipos de Prevnar de la siguiente generación de vacunas conjugadas neumocócicas sino más bien añadir serotipos para obtener una protección más amplia.

Inclusión de los serotipos 1, 3, 5 y 7F

En los Estados Unidos, el índice de ENI causado por el serotipo 1 en niños de menos de 5 años es < del 2%, aproximadamente el mismo que para cada uno de los 3 tipos y 7F [1,6]. Los serotipos 1 y 5 representan los índices más elevados de ENI en poblaciones de Estados Unidos de alto riesgo para la enfermedad neumocócica invasiva. Específicamente, el serotipo 1 causa el 3,5% de ENI en niños nativos de Alaska < 2 años de edad, y el 18% en niños de 2-4 años de edad [11]. Tanto el serotipo 1 como el serotipo 5 causan de manera significativa enfermedades en otras partes del mundo y en poblaciones indígenas en países desarrollados [12, 13, 14].

El serotipo 1 también puede asociarse con enfermedades más graves en comparación con otros serotipos neumocócicos [15]. Esta observación se basa en la diferencia en cuanto a índices de identificación de casos entre los Estados Unidos y Europa y la diferencia asociada en la práctica médica. En términos generales, la frecuencia de ENI es menor en Europa que en los Estados Unidos. Sin embargo, el porcentaje de ENI causado por el serotipo 1 en Europa es desproporcionadamente mayor que en el de los Estados Unidos (6-7%, frente al 1-2%, respectivamente). En Europa, se obtienen cultivos de sangre predominantemente de niños hospitalizados. En los Estados Unidos, es una práctica médica habitual obtener cultivos de sangre en ambulatorios de niños que presentan fiebre alta ≥ 39 °C y recuentos de leucocitos elevados. Dada la diferencia en la práctica médica, se supone que el porcentaje más bajo de enfermedad causada por el serotipo 1 en los Estados Unidos puede diluirse por índices mayores de otros serotipos que causan enfermedad leve, mientras que el mayor porcentaje en Europa refleja la enfermedad más grave. Además, estudios seroepidemiológicos de niños con neumonía complicada demuestran que el serotipo 1 está desproporcionadamente representado [16, 17, 18]. Esto sugiere que la inclusión del serotipo 1 puede reducir la cantidad de enfermedades neumocócicas graves, así como a contribuir a una reducción total en cuanto a la enfermedad neumocócica invasiva.

La adición de los serotipos 3 y 7F aumentará la protección contra EIN en la mayoría de las áreas del mundo aproximadamente del 3% - 7% y en Asia aproximadamente el 9%. Por tanto, una vacuna 11- valente protegerá un 50% en Asia y aproximadamente un 80% de EIN en todas las demás regiones [1,2]. Estos serotipos también son importantes con respecto a la protección contra la otitis media [19]. Un estudio multinacional de serotipos neumocócicos causantes de otitis media, Hausdorff y col descubrieron que el serotipo 3 era en general el 8° aislado líquido del oído medio más común [20]. El serotipo 3 representa hasta el 8,7% de los serotipos neumocócicos asociados con la otitis media. Por tanto, la importancia de los tipos 3 y 7F en la otitis media, así como en ENI, justifica su inclusión en una vacuna conjugada neumocócica.

Sin embargo, intentos realizados para producir una vacuna conjugada neumocócica multivalente que presente inmunogenicidad significativa con respecto a polisacáridos del serotipo 3 no han tenido éxito. Por ejemplo, en un estudio de inmunogenicidad y seguridad de una vacuna conjugada con proteína D neumocócica 11-valente (11-Pn-PD), no se observaron efectos destacados para el serotipo 3 en bebés que habían recibido tres dosis de la vacuna después de una dosis de refuerzo de cualquiera de la misma vacuna o de una vacuna polisacárida neumocócica (Nurkka y col (2004) Ped. Inf. Dis. J., 23:1008-1014). En otro estudio, los resultados de un ensayo opsonofagocítico (OPA) de niños que habían recibido dosis de 11-Pn-PD no mostraron respuestas frente anticuerpos para el serotipo 3 a niveles comparables con otros serotipos ensayados (Gatchalian y col, 17th Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed: Inf. Dis. (ESPID), Poster N° 4, P1A Poster Session 1, Estambul, Turquía, 27 de marzo 27 del 2001). En otro estudio adicional, cuando se evaluó la eficacia de una vacuna 11-Pn-PD en la prevención de otitis media aguda, la vacuna no proporcionó protección contra episodios causados por el serotipo 3 (Prymula y col (2006) Lancet, 367:740-748). Por consiguiente, una vacuna conjugada neumocócica que comprenda polisacáridos capsulares del serotipo 3 y que sea capaz de suscitar una respuesta inmunogénica contra polisacáridos del serotipo 3 proporciona una mejora significativa sobre el estado de la técnica existente.

Inclusión de los serotipos 6A y 19A***a. Epidemiología de los serotipos 6A y 19A***

Los datos de observaciones descritos en la bibliografía sugieren que los serotipos 6A y 19A suponen enfermedades neumocócicas más invasivas en niños < 2 años en los Estados Unidos que los serotipos 1, 3, 5 y 7F combinados (FIG. 1) [1,5]. Además, estos serotipos se asocian normalmente con resistencia a antibióticos (FIG. 2) y

desempeñan una función importante en la otitis media [6,19,20]. La capacidad de la vacuna Prevnar actual para proteger contra enfermedades debido a 6A y 19A no está clara. Más adelante se analiza la razón para incluir los componentes 6A y 19A en una vacuna 13vPnC.

b. Respuestas contra los serotipos 6A y 19A inducidas por los polisacáridos 6B y 19F

5 Las vacunas polisacáridas neumocócicas no conjugadas autorizadas (para su uso en personas de al menos dos años de edad) poseen en su interior polisacáridos capsulares 6A o 6B pero no ambos [21]. Los datos de inmunogenicidad generados en el momento de la formulación de la vacuna polisacárida neumocócica 23-valente demostraron que una vacuna monovalente 6B inducía anticuerpos contra cápsulas 6A y 6B. Los datos de diversos estudios realizados que evalúan respuestas de IgG y ensayos opsonofagocíticos (OPA) en una diversidad de poblaciones con polisacáridos libres y con vacunas conjugadas neumocócicas sugirieron que las respuestas de IgG contra 6A están inducidas por antígenos 6B, pero las respuestas son generalmente más bajas y la actividad OPA con organismos 6A es diferente que la de con organismos 6B [22,23,24,25]. Además, sujetos que responden con altas concentraciones de anticuerpos 6B pueden tener escasa actividad o ninguna contra 6A.

15 A diferencia de la composición química de los polisacáridos capsulares 6A y 6B, en la que existe un alto grado de similitud, las cápsulas 19A y 19F son muy diferentes debido a la presencia de dos cadenas laterales adicionales en el polisacárido 19A. De manera no sorprendente, respuestas inmunitarias medidas en voluntarios humanos inmunizados con la vacuna polisacárida 19F demostraron que las respuestas contra 19F eran inducidas en el 80% de sujetos, pero solamente el 20% de sujetos tuvieron una respuesta contra 19A [26]. Niveles bajos de respuestas IgG y OPA de reacción cruzada contra el serotipo 19A después de inmunización con el polisacárido 19F también se habían documentado en estudios realizados con vacunas conjugadas [24,26].

20 A partir del estudio puente con 7vPnC (D118-P16) realizado en bebés en los Estados Unidos (FIG. 3) se han generado datos internos sobre respuestas OPA de reacción cruzada contra 6A y 19A. Estos estudios coinciden con los hallazgos de otros y demuestran la inducción de anticuerpos funcionales de reacción cruzada contra el polisacárido 6A después de inmunización con el polisacárido 6B, aunque a un nivel más bajo, y muy pocos anticuerpos funcionales contra 19A después de inmunización con 19F.

Impacto de inmunización 6B y 19F sobre 6A y 19A en modelos animales

30 Para evaluar la posible protección cruzada con inmunización de polisacáridos se usaron modelos animales. En un modelo de otitis media desarrollado por Giebink y col, se inmunizaron chinchillas con una vacuna conjugada de proteína de membrana externa (PME) con polisacárido tetravalente (que contenía los sacáridos 6B, 14, 19F, 23F) o placebo [27]. En este estudio parecía haber alguna protección cruzada para 6A; sin embargo esta no alcanzó significado estadístico y el nivel de protección fue inferior que con 6B contra la otitis media. En este mismo modelo hubo una protección del 100% contra 19F en otitis media, pero solamente una protección del 17% contra 19A en otitis media.

35 Saeland y col usaron suero de bebés inmunizados con una vacuna conjugada contra el tétanos neumocócica 8-valente (que contenía 6B y 19F) para inmunizar pasivamente ratones antes de una exposición intranasal con organismo 6A, en un modelo de infección pulmonar [28]. De las 59 muestras de suero, se protegió al 53% de los ratones contra bacteriemia con 6B y el 37% se protegió contra 6A. En el mismo modelo, a los ratones inmunizados pasivamente con suero de bebés inmunizados con cuatro dosis de una vacuna conjugada neumocócica 11-valente (que contenía 19F conjugado con el toxoide tetánico) se les proporcionó una exposición intranasal con organismos 19A [29]. De 100 ratones inmunizados pasivamente y después expuestos, 60 ratones no presentaron organismos 19A detectados en el tejido pulmonar, mientras que se identificaron organismos en el resto de ratones a los que se les había proporcionado placebo con solución salina. Sin embargo, la inmunización pasiva no protegió contra la exposición con organismos 19F en este modelo; por lo tanto, la utilidad del modelo para el serogrupo 19 es cuestionable. En general estos modelos proporcionan pruebas de algún impacto biológico de inmunización 6B en organismos 6A aunque el efecto sobre el serotipo heterólogo no fue tan grande como el observado con el serotipo homólogo. El impacto de inmunización 19F sobre organismos 19A no se comprende bien en estos modelos.

Impacto de inmunización con conjugados polisacáridos 6B y 19F sobre enfermedades 6A y 19A en estudios de eficacia/eficiencia

50 En la Tabla 1 se indica el número de casos de enfermedades debidas a los serotipos 6B, 6A, 19F y 19A en estudios de eficacia realizados con las vacunas 7vPnC y 9vPnC (7vPnC más los serotipos 1 y 5) [30,10,31]. El número de casos de enfermedades invasivas son demasiado escasos para permitir extraer cualquier conclusión para los serotipos 6A y 19A. Sin embargo, el estudio de otitis media de Finnish generó una gran cantidad de aislados neumocócicos [32]. En el análisis por protocolo, la vacuna 7vPnC tuvo una eficacia del 84% (IC del 95%, 62%, 93%) contra la otitis media debido al serotipo 6B y del 57% (IC del 95%, 24%, 76%) contra la otitis media debido al serotipo 6A (Tabla 1). Por otro lado, para la otitis media, la eficacia específica de serotipo con la vacuna 7vPnC no se demostró debido a cualquiera de 19F o 19A.

Tabla 1. Casos de enfermedades neumocócicas debido a los serotipos 6B, 6A, 19F y 19A en estudios de eficacia realizados con las vacunas 7vPnC y 9vPnC.

	6B		6A		19F		19A	
	PnC	Contr.	PnC	Contr.	PnC	Contr.	PnC	Contr.
Estudio de eficacia de Kaiser-7vPnC (ITT)	1	7	0	1	2*	13	0	1
Estudio de eficacia de Navajo-7vPnC (ITT)	0	5	1	0	1	1	1	0
Estudio de eficacia del sur de África-9vPnC VIH (-) (ITT)	1	2	1	0	0	1	3	1
Estudio de eficacia del sur de África-9vPnC VIH(+) (ITT)	1	7	3	10	2	3	2	3
Estudio de Otitis Media de Finnish-7vPnC (PP)	9*	56	19*	45	43	58	17	26

* Eficacia estadísticamente significativa demostrada

A partir de referencias 30, 10 y 33 y comunicaciones personales

Contr= control

ITT= análisis por intención de tratar

PP = análisis por protocolo

5 Para evaluar la eficacia de Prevnar [33], se dispone también de datos de un estudio de control de casos de observación de ENI post-venta realizado por los Centros para el Control de Enfermedades (CCE) En los laboratorios de observación se identificaron casos de enfermedades invasivas neumocócicas producidas en niños de 3 a 23 meses de edad y coincidieron con tres casos de control por edad y código postal. Después de obtener el consentimiento de los padres y de los proveedores de servicios médicos, para el estudio de casos y controles, se

5 obtuvo el historial médico y la inmunización (los sujetos se consideraron inmunizados si habían recibido al menos una dosis de Pevnar). Los estudios preliminares se presentaron en la reunión ICAAC 2003 y en la Tabla 2 se presenta un resumen de los hallazgos para enfermedades 6B, 19F, 19A y 6A. Estos datos indican que Pevnar es capaz de prevenir enfermedades debido a 6A, aunque a un nivel que puede ser algo inferior al de enfermedades por el serotipo 6B. Estos datos también indican que la protección cruzada para enfermedades invasivas debido a 19A está limitada.

Tabla 2. Resultados preliminares de un estudio de control de casos realizado por el CCE (presentado en ICAAC, 2003)

Serotipo	Conjuntos Informativos, n	EV* (IC del 95%)
Tipo de vacuna, todos	115	94 (87, 97)
Relacionado con vacuna, todos	36	70 (38, 86)
Tipo No vacuna, todos	43	-4 (-106,48)
6B	27	94 (72, 99)
19F	19	73 (16,92)
6A	15	87 (53, 97)
19A	16	40 (-87, 80)
*Eficacia de la vacuna que compara vacunados (≥ 1 dosis) frente a no vacunados y ajustada para afecciones subyacentes		
Referencia 40 y comunicación personal/confidencial		

10 Un análisis publicado [3] del uso de Pevnar también indica que los serotipos 6B y 19F confieren una reducción moderada en cuanto a ENI ocasionadas por los serotipos 6A y 19A entre niños menores de dos años (Tabla 1 en [3]). Los índices de enfermedades entre adultos inmunizados causadas por los serotipos 6A, 9A, 9L, 9N, 18A, 18B, 18F, 19A, 19B, 19C, 23A y 23B ("todos los serotipos relacionados con la vacuna") se redujeron algo (Tabla 2 en [3]).
15 Estos datos establecen que la inmunidad colectiva procedente del uso de Pevnar en niños menores de dos años fue modesta para los serotipos 6A y 19A y proporciona una base para la inclusión de los serotipos 6A y 19A en la vacuna 13vPnC de la presente invención.

Conclusión para la adición de 6A y 19A

20 Los resultados de los datos de observación post-venta y del estudio de control de casos indicados en la FIG. 1 y en la Tabla 2 con la vacuna 7vPnC sugieren que, de acuerdo con otra información sobre respuestas inmunes y resultados en los modelos animales descritos anteriormente, puede existir alguna protección cruzada contra enfermedades por 6A, pero a un menor grado que contra enfermedades por 6B. Adicionalmente, parece que la protección contra 19A está limitada. Por lo tanto, una vacuna 137vPnC que contenga los serotipos 6A y 19A proporciona una protección que no depende de las limitaciones de la protección cruzada de serogrupos por los serotipos 6B y 19F.

25 La presente descripción proporciona una composición inmunogénica multivalente que comprende 13 conjugados de proteína-polisacárido distintos, en el que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado con una proteína transportadora, y en el que los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae*, junto con un vehículo fisiológicamente aceptable. Una proteína transportadora de este tipo es el toxoide diftérico denominado CRM₁₉₇. La

composición inmunogénica puede comprender adicionalmente un adyuvante, tal como un adyuvante basado en aluminio, tal como fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

Los polisacáridos capsulares se preparan mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. En la presente divulgación los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae*. Estos conjugados neumocócicos se preparan por procesos independientes y se formulan en una sola formulación de dosificación. Por ejemplo, en una realización, cada serotipo de polisacárido neumocócico se cultiva en un medio basado en soja. Los polisacáridos individuales se purifican después mediante centrifugación, precipitación, ultrafiltración y cromatografía de columna. Los polisacáridos purificados se activan químicamente para fabricar los polisacáridos capaces de reaccionar con la proteína transportadora.

Una vez activado, cada polisacárido capsular se conjuga individualmente con una proteína transportadora para formar un glucoconjugado. En una realización, cada polisacárido capsular se conjuga con la misma proteína transportadora. En esta realización, la conjugación se efectúa por aminación reductora.

La activación química de los polisacáridos y posterior conjugación con la proteína transportadora se consigue mediante medios convencionales. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.673.574 y 4.902.506 [34,35].

Preferentemente, las proteínas transportadoras son proteínas no-tóxicas y no-reactogénicas y que pueden obtenerse con suficiente cantidad y pureza. Las proteínas transportadoras deben prestarse a procedimientos de conjugación convencionales. En una realización particular de la presente invención, como proteína transportadora se usa el toxoide diftérico CRM₁₉₇.

El CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de la toxina diftérica aislada de cultivos de la cepa C7 de *Corynebacterium diphtheriae* (β 197) cultivada en un medio basado en casaminoácidos y extracto de levadura. El CRM₁₉₇ se purifica mediante ultrafiltración, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. Como alternativa, el CRM₁₉₇ se prepara de manera recombinante de acuerdo con la Patente de Estados Unidos N° 5.614.382. También son adecuados, para su uso como proteínas transportadoras, otros toxoides diftéricos.

Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas tales como el toxoide tetánico, el toxoide tosferínico, toxoide colérico (como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO2004/083251 [38]), TL de *E. coli*, ST de *E. coli* y la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden usarse proteínas de membrana externa bacterianas tales como el complejo c de la membrana externa (CPME), porinas, proteínas de unión a transferrina, pneumolisina, la proteína A de superficie neumocócica (PspA), la proteína de adhesina neumocócica (PsaA), la peptidasa C5a de streptococcus del grupo A o del grupo B o la proteína D de *Haemophilus influenzae*. Como proteínas transportadoras, también pueden usarse otras proteínas, tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (HLC), albúmina de suero bovino (ASB) o derivado proteínico purificado (DPP) de tuberculina.

Después de la conjugación del polisacárido capsular con la proteína transportadora, los conjugados polisacárido-proteína se purifican (enriquecidos con respecto a la cantidad de conjugado polisacárido-proteína) mediante diversas técnicas. Estas técnicas incluyen operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía de columna y filtración en profundidad. Véanse los ejemplos indicados más adelante.

Después de purificar los glucoconjugados individuales, se combinan para formular la composición inmunogénica que puede usarse como una vacuna. La formulación de la composición inmunogénica puede conseguirse usando procedimientos reconocidos en la materia. Por ejemplo, para preparar la composición, los 13 conjugados neumocócicos individuales pueden formularse con un vehículo fisiológicamente aceptable. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprenderá uno o más adyuvantes. Como se define en el presente documento, un "adyuvante" es una sustancia que sirve para potenciar la inmunogenicidad de una composición inmunogénica de la presente divulgación. Por tanto, los adyuvantes se proporcionan frecuentemente para reforzar la respuesta inmunitaria y se conocen bien por los expertos en la materia. Los adyuvantes adecuados para potenciar la eficacia de la composición incluyen, pero sin limitación:

(1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.;

(2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como muramil péptidos (definidos más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo,

(a) MF59 (Publicación PCT N° WO 90/14837), que contiene escualeno 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5% (conteniendo opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase más

adelante, aunque no es necesario)) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA),
 (b) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero L121 bloqueado con pluronic al 5% y thr-MDP (véase más adelante) microfluidizado en una emulsión submicrométrica o sometido a agitación vorticial para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande y
 (c) sistema adyuvante RibitTM (SAR), (Corixa, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2% y uno o más de los componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A 3-O-desacilado (MPLTM) descrito en la Patente de Estados Unidos N° 4.912.094 (Corixa), dimicolato de trehalosa (DMT) y el esqueleto de la pared celular (EPC), preferentemente MPL + EPC (DetoxTM);

(3) pueden usarse adyuvantes de saponina, tales como Quil A o STIMULONTM QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (Patente de Estados Unidos N° 5.057.540) o partículas generadas de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes);

(4) lipopolisacáridos bacterianos, análogos sintéticos del lípido A, tales como compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (FAG) o derivados o análogos de los mismos, están disponibles de Corixa y que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.113.918; uno de tales FAG es 2-[(R)-3-tetradecanoil-oxitetradecanoil-amino]etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoil-oxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoil-oxitetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranosido, que también se conoce como 529 (normalmente conocido como RC529), que se formula como una forma acuosa o como una emulsión estable, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen el motivo (o los motivos) CpG (Patente de Estados Unidos N° 6.207.646);

(5) citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, etc.), interferones (por ejemplo, gamma interferón), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (FEC-GM), factor estimulante de colonias de macrófagos (FEC-M), factor de necrosis tumoral (FNT), moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2, etc.;

(6) mutantes destoxificados de una toxina ADP- ribosilante bacteriana tal como la toxina colérica (TC) en una forma silvestre o mutante, por ejemplo, en la que el ácido glutámico en la posición 29 del aminoácido se sustituye por otro aminoácido, preferentemente una histidina, de acuerdo con la solicitud de patente internacional publicada N° WO 00/18434 (véase también WO 02/098368 y WO 02/098369), una toxina tosferínica (TT) o una toxina termolábil (TL) de *E. coli*, particularmente TL-K63, TL-R72, CT-S109, PT-K9/G129 (véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/13302 y WO 92/19265); y

(7) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para potenciar la eficacia de la composición.

Los muramil péptidos incluyen, pero sin limitación N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2' dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

Las formulaciones de vacuna de la presente divulgación pueden usarse para proteger o tratar a un ser humano susceptible a una infección neumocócica por medio de la administración de la vacuna mediante una vía sistémica o mucosa. Esas administraciones pueden incluir inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante administración mucosa en el tracto oral/alimentario, respiratorio o genitourinario. En una realización, para el tratamiento de neumonía u otitis media se usa la administración intranasal (ya que el transporte nasofaríngeo de neumococos puede evitarse más eficazmente, atenuando por tanto la infección en su estado más precoz).

La cantidad del conjugado en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos significativos. Tal cantidad puede variar dependiendo del serotipo neumocócico. Generalmente, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de polisacárido, particularmente de 0,1 a 10 µg y más particularmente de 1 a 5 µg.

Las cantidades óptimas de los componentes para una vacuna en particular pueden determinarse mediante estudios convencionales que implican la observación de las respuestas inmunitarias apropiadas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas adecuadamente.

En una realización particular, la vacuna 13vPnC es una formulación líquida estéril de polisacáridos capsulares neumocócicos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F individualmente conjugados con CRM₁₉₇. Cada dosis de 0,5 ml se formula para contener: 2 µg de cada sacárido, excepto para 6B a 4 µg; aproximadamente 29 µg de proteína transportadora CRM₁₉₇; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y tampón de cloruro de sodio y de succinato de sodio como excipientes. El líquido se carga en jeringas de dosis individuales sin conservante. Después de agitar, la vacuna es una suspensión homogénea blanca lista para la administración intramuscular.

La elección del nivel de dosis para la vacuna 13vPnC es similar a la de la vacuna 7vPnC comercializada (Prennar). Para todos los serotipos, se seleccionó un nivel de dosis de sacárido de 2 µg, excepto para el 6B, que fue de 4 µg por dosis. La vacuna 7vPnC ha demostrado seguridad, inmunogenicidad y eficacia deseables contra ENI a un nivel

de dosis de sacárido de 2 µg para los serotipos 4, 9V, 14, 18C, 19F y 23F y a la dosis de 4 µg para el serotipo 6B.

El programa de inmunización puede seguir el diseñado para la vacuna 7vPnC. Por ejemplo, el programa rutinario para bebés y niños pequeños contra enfermedades invasivas causadas por *S. pneumoniae* debido a los serotipos incluidos en la vacuna 13vPnC es 2, 4, 6 y 12-15 meses de edad. Las composiciones de la presente divulgación son también adecuadas para su uso en niños mayores, adolescentes y adultos.

Las composiciones de la presente divulgación también pueden incluir uno o más antígenos adicionales para su uso contra la otitis media causada por infección con otras bacterias. Tales bacterias incluyen *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis* (antiguamente conocida como *Branhamella catarrhalis*) y *Alloicoccus otitidis* no tipificables.

Los ejemplos de antígenos de *Haemophilus influenzae* no tipificable adecuados para la inclusión incluyen la proteína P4 conocida también como proteína "e" (Patente de Estados Unidos N° 5.601.831; Solicitud de Patente Internacional WO03/078453), la proteína P6, también conocida como proteína PAL o PBOMP-1 (Patente de Estados Unidos N° 5.110.908; Solicitud de Patente Internacional WO0100790), la proteína P5 (Patente de Estados Unidos reexpedida N° 37.741), la proteína de adhesión y penetración de *Haemophilus* (Patente de Estados Unidos N° 6.245.337 y 6.676.948), la proteína adhesina de tipo LKP (Patente de Estados Unidos N° 5.643.725) y la proteína NucA (Patente de Estados Unidos N° 6.221.365).

Ejemplos de antígenos de *Moraxella catarrhalis* adecuados para la inclusión incluyen la proteína UspA2 (Patentes de Estados Unidos N° 5.552.146, 6.310.190), la proteína CD (Patente de Estados Unidos N° 5.725.862), la proteína E (Patente de Estados Unidos N° 5.948.412) y la proteína de membrana externa de 74 kilodalton (Patente de Estados Unidos N° 6.899.885).

Los ejemplos de antígenos de *Alloicoccus otitidis* adecuados para la inclusión incluyen los identificados en la Solicitud de Patente Internacional WO03/048304.

Las composiciones de la presente descripción también pueden incluir una o más proteínas de *Streptococcus pneumoniae*. Ejemplos de proteínas de *Streptococcus pneumoniae* adecuados para la inclusión incluyen los identificados en la Solicitud de Patente Internacional WO02/083855, así como los descritos en la Solicitud de Patente Internacional WO02/053761.

Las composiciones de la presente descripción pueden incluir adicionalmente una o más proteínas de Neisseria meningitidis de tipo B. Los ejemplos de proteínas de Neisseria meningitidis de tipo B adecuados para la inclusión incluyen los identificados en las Solicitudes de Patente Internacional WO03/063766, WO2004/094596, WO01/85772, WO02/16612 y WO01/87939.

Activación del polisacárido del serotipo 3 de *S. pneumoniae* para la conjugación

La oxidación parcial de hidratos de carbono en polisacáridos se ha utilizado eficazmente para generar grupos aldehído que después se acoplan a los restos de lisina de proteínas transportadoras para generar conjugados inmunogénicos (es decir, composiciones tales como vacunas, útiles para estimular o suscitar una respuesta inmuno-específica en un vertebrado). Para muchas aplicaciones, el propósito general del peryodato de sodio como agente oxidante proporciona una oxidación eficaz de hidratos de carbono en polisacáridos antes de la conjugación con proteínas transportadoras. Sin embargo, la oxidación directa del polisacárido Pn 3 con peryodato de sodio puede producir polisacáridos degradados con pocos aldehídos restantes presentes. Un procedimiento de oxidación alternativo incorpora ácido peryódico en presencia de cationes bivalentes (por ejemplo, Mg²⁺ o Ca²⁺ y proporciona una oxidación eficaz del polisacárido Pn 3 (Tabla 3).

Tabla 3: Datos de oxidación de Pn 3 usando ácido peryódico/MgCl₂

ID muestra	Cantidad de ácido peryódico (meq)**	Oxidación (horas)	Temperatura (°C)	GO N°***	Kd N° (CL4B)
PP3* Nativo	0	-	4	0,0	0,048
PP3* Oxidado	0,2	16	25	5,8	0,24
PP3* Oxidado	0,2	72	4	9,0	0,1
PP3* Oxidado	1	16	4	13,2	0,24
PP3* Oxidado	1	16	25	4,1	0,24
PP3* Oxidado	1	72	4	7,9	0,29

*PP3: Pneumo polisacárido nativo de tipo 3
 **Meq: equivalente en moles
 ***GO: Grado de oxidación

Para reducir la viscosidad y los problemas de filtración asociados, el polisacárido Pn 3 se sometió primero a hidrólisis/despolimerización usando un ácido suave, tal como ácido acético, ácido cítrico o ácido carbónico. La oxidación parcial para producir el polisacárido Pn 3 activado se realiza después de la hidrólisis/despolimerización usando cantidades controladas de un agente oxidante. Puede usarse cualquier agente oxidante selectivo que oxide un grupo hidroxilo terminal de un aldehído, incluyendo oxidasas de azúcar específicas (por ejemplo peryodato sódico o potásico o ácido peryódico). Como se ha indicado anteriormente, un agente oxidante preferido es el ácido peryódico en presencia de cationes bivalentes. Después, el polisacárido Pn 3 activado se purifica opcionalmente (por ejemplo, mediante diafiltración frente a solución salina tamponada).

El polisacárido Pn 3 activado puede combinarse con una proteína transportadora. Las proteínas transportadoras se seleccionan para aumentar la inmunogenicidad del polisacárido Pn 3 unido y/o suscitar anticuerpos contra la proteína transportadora que son beneficiosos desde el punto de vista del diagnóstico, analítico y/o terapéutico. La unión covalente de una molécula antigénica (por ejemplo, un polisacárido) a un transportador confiere inmunogenicidad potenciada y dependencia de linfocitos T (Pozsgay y col. (1999) PNAS, 96:5194-97; Lee y col. (1976) J. Immunol., 116:1711-18; Dintzis y col. (1976) PNAS, 73:3671-75). Como se describe en el presente documento las proteínas transportadoras útiles incluyen toxinas bacterianas inactivadas tales como el toxoide tetánico, el toxoide tosferínico, el toxoide colérico (como se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Internacional WO2004/083251), TL de *E. coli*, ST de *E. coli* y una exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden usarse proteínas de membrana externa bacterianas tales como el complejo c de la membrana externa, porinas, proteínas de unión a transferrina, pneumolisina, la proteína A de superficie neumocócica, la proteína de adhesina neumocócica, la peptidasa C5a de streptococcus del grupo A o del grupo B o la proteína D de *Haemophilus influenzae*. Como proteínas transportadoras también pueden usarse otras proteínas, tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero bovino o derivado proteínico purificado de tuberculina. Una proteína transportadora preferida es la toxina diftérica mutada CRM₁₉₇. Opcionalmente, después de combinarse con la proteína transportadora, la mezcla de polisacárido Pn 3 activado/proteína transportadora se congela (por ejemplo, congelación en carcasa) y se co-liofiliza.

La conjugación se realiza haciendo reaccionar la mezcla de polisacárido Pn 3 activado/proteína transportadora con un agente reductor, tal como cianoborohidruro de sodio. Los aldehídos que no han reaccionado se protegen después mediante reducción con borohidruro de sodio. El conjugado se purifica (por ejemplo por diafiltración frente a tampón fosfato seguido de solución salina tamponada), proporcionando un concentrado en lote final del glucoconjugado en solución salina tamponada.

La anterior descripción describe en general la presente invención. Puede obtenerse una mayor comprensión por referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación del polisacárido capsular de serotipo 1 de *S. Pneumoniae*

Preparación de bancos de células maestro y de trabajo

El serotipo 1 de *S. Pneumoniae* se obtuvo de la cepa 6301 de la Colección de Americana de Cultivos Tipo, ATCC. Se crearon diversas generaciones de reservas de semilla para ampliar la cepa y eliminar los componentes de origen animal (generaciones F1, F2 y F3). Se produjeron dos generaciones adicionales de reservas de semilla. La primera generación adicional se preparó a partir de un vial de F3 y la generación posterior se fabricó a partir de un vial de la primera generación adicional. Los viales con semilla se conservaron congelados (<-70°C) con glicerol sintético como crioconservante. Además de viales congelados, se prepararon viales liofilizados para la generación F4. Para la preparación de banco de células, todos los cultivos se cultivaron en un medio basado en soja. Antes de congelar, las células se concentraron por centrifugación, se eliminó el medio usado y los sedimentos celulares se resuspendieron en medio reciente que contenía un crioconservante tal como glicerol sintético.

Fermentación y recogida

Para inocular frascos de semillas que contenían medio basado en soja se usaron los cultivos del banco de células de trabajo. Los frascos se incubaron a 36 °C ± 2 °C sin agitación hasta alcanzar las necesidades del cultivo. Se usó un frasco de semilla para inocular un fermentador de semillas que contenía medio basado en soja. Se mantuvo un pH de aproximadamente 7,0 con solución de carbonato de sodio estéril. Después de alcanzar la densidad óptica diana, se usó el fermentador de semillas para inocular el fermentador de producción que contenía medio basado en soja. El pH se mantuvo con solución de carbonato de sodio estéril. La fermentación concluyó después del cese del crecimiento o cuando se alcanzó el volumen de trabajo del fermentador. Al cultivo se le añadió una cantidad apropiada de desoxicolato sódico al 12% estéril para realizar la lisis de las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a las células. Después de la lisis, se enfrió el contenido del fermentador. El pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a aproximadamente 6,6 con ácido acético. El lisado se depuró por centrifugación de flujo continuo seguido de filtración en profundidad y microfiltración a 0,45 µm.

En un proceso alternativo, el pH de la fermentación de aproximadamente 7,0 se mantuvo con NaOH 3N. Después de alcanzar la densidad óptica diana, se usó el fermentador de semilla para inocular el fermentador de producción que contenía medio basado en soja. El pH se mantuvo con NaOH 3N. La fermentación concluyó después del cese del crecimiento o cuando se alcanzó el volumen de trabajo del fermentador. Al cultivo se le añadió una cantidad apropiada de desoxicolato sódico al 12% estéril para obtener una concentración al 0,12% en el caldo, para realizar la lisis de las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a las células. Después de la lisis, el contenido del fermentador se mantuvo, con agitación, durante un intervalo de tiempo entre 8 y 24 horas a una temperatura entre 7 °C y 13 °C, para garantizar que se había producido la lisis celular por completo y la liberación del polisacárido. La agitación durante este periodo de mantenimiento impidió que el sedimento del lisado se asentase en las paredes del fermentador y en la sonda del pH, permitiendo de esta manera mantener la integridad de la sonda del pH. Después, el pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a aproximadamente un pH de 5,0 con ácido acético al 50%. Después de un tiempo de mantenimiento sin agitación, durante un intervalo de tiempo entre 12 y 24 horas a una temperatura entre 15 °C y 25 °C, se extrajo una parte significativa de las proteínas previamente solubles de la solución como un precipitado sólido con una pequeña pérdida o degradación del polisacárido, que permaneció en solución. Después, la solución con el precipitado se depuró por centrifugación de flujo continuo seguido de filtración en profundidad y microfiltración a 0,45 µm.

Purificación

La purificación del polisacárido neumocócico consistió en diversas operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y etapas de filtración en profundidad. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente a menos que se especifique de otra manera.

El caldo depurado de los cultivos del fermentador del serotipo 1 de *S. pneumoniae* se concentró y se diafiltró usando un filtro de MWCO (límite de peso molecular en kiloDalton) de 100 kDa. La diafiltración se consiguió usando tampón de fosfato sódico a pH neutro. La diafiltración eliminó del medio los componentes de bajo peso molecular de los biopolímeros de mayor peso molecular tales como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos.

El polisacárido se precipitó de la solución concentrada y diafiltrada añadiendo bromuro de hexadeciltrimetilamonio (BH) procedente de una solución de reserva para proporcionar una concentración final de BH al 1% (p/v). El precipitado polisacárido/BH se capturó en un filtro de profundidad y el filtrado se desechó. El precipitado con el polisacárido se volvió a disolver y se eluyó volviendo a poner en circulación una solución de cloruro de sodio a través del filtro de profundidad que contenía el precipitado. Los filtros se aclararon después con una solución de cloruro de sodio adicional.

A la solución con el polisacárido se le añadió yoduro de sodio (NaI) procedente de una solución de reserva de NaI para conseguir una concentración final del 0,5% para precipitar el BH. El precipitado se eliminó por filtración en profundidad. El filtrado contenía el polisacárido diana. El recipiente de precipitación y el filtro se aclararon con una solución de NaCl/NaI y el aclarado se combinó con la solución parcialmente purificada del polisacárido. El filtro se eliminó. Después, el polisacárido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

La solución con el polisacárido se concentró sobre un ultrafiltro de MWCO de 30 kDa y se diafiltró con una solución de cloruro de sodio.

La solución con el polisacárido purificado parcialmente se purificó adicionalmente por filtración a través de un filtro de profundidad impregnado con carbono activado. Después de la filtración, el filtro de carbono se aclaró con una solución de cloruro de sodio. El aclarado se combinó con la solución con el polisacárido, que después se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

La solución con el polisacárido se concentró sobre un ultrafiltro de MWCO de 30 kDa y se ajustó con un tampón de fosfato de sodio 1 M para conseguir una concentración final de fosfato de sodio de 0,025 M. El pH se comprobó y se ajustó a un pH de $7,0 \pm 0,2$.

La columna de cerámica de hidroxiapatita (HA) se equilibró con tampón de fosfato de sodio que contenía cloruro de sodio para obtener la conductividad apropiada ($<15 \mu\text{S}$). La solución con el polisacárido se cargó después sobre la columna. En estas condiciones, las impurezas se unieron a la resina y el polisacárido se recuperó en el flujo a través de la columna. La solución con el polisacárido se filtró a través de filtros en línea de 0,2 µm situados antes y después de la columna.

La solución con el polisacárido se concentró usando un filtro de MWCO de 30 kDa. El concentrado de diafiltró después con Agua Para Inyección (API).

La solución diafiltrada con el polisacárido se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm en frascos de polipropileno. Las muestras se extrajeron para el ensayo de liberación y el polisacárido purificado se conservó congelado a $-25^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$.

Caracterización

Los datos de RMN-1H concordaron con la estructura química por cesión de señales cedidas a los protones de la molécula de polisacárido. El espectro de RMN-1H mostró una serie de señales bien resueltas (protones del grupo metilo) para la cuantificación del grupo funcional O-acetilo en el polisacárido.

5 La identidad del polisacárido monovalente se confirmó por inmunoelectroforesis en contracorriente usando antisueros específicos.

Para calcular el peso molecular se usó cromatografía de filtración en gel de alto rendimiento acoplada con detectores de índice refractario y de dispersión multiángulo de luz láser (MALLS) junto con la concentración de la muestra.

10 Para perfilar la distribución de tamaño molecular relativa del polisacárido se usó medio de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B).

Ejemplo 2**Preparación del conjugado sacárido neumocócico de serotipo 1 - CRM₁₉₇**Activación y conjugación

15 Se descongelaron envases del polisacárido purificado y se combinaron en un recipiente de reacción. Al recipiente se añadió carbonato de sodio 0,2 M, pH 9,0, para la desacetilación parcial (hidrólisis) durante 3 horas a 50 °C. La reacción se enfrió a 20 °C y la neutralización se realizó mediante ácido acético 0,2 M. La oxidación se realizó en presencia de peryodato de sodio incubando a 2-8 °C y la mezcla se agitó durante 15-21 horas.

20 La mezcla de la reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con NaCl al 0,9% usando una membrana de MWCO de 30 kDa. El retenido se filtró a 0,2 µm. El sacárido activado se cargó en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml y se congelaron en carcasa a -75 °C y se liofilizaron.

25 La "congelación en carcasa" es un procedimiento para preparar muestras por liofilización (criodesecación). Los matraces giran automáticamente mediante rodillos accionados a motor en un lote refrigerado que contiene alcohol o cualquier líquido apropiado. Un fino recubrimiento de producto se congela homogéneamente alrededor de la "carcasa" interna de un matraz, permitiendo procesar con seguridad un mayor volumen de material durante cada proceso de criodesecación. Estas unidades refrigeradas, automatizadas proporcionan un medio simple y eficaz de congelación previa de muchos matraces al mismo tiempo, produciendo los revestimientos deseados en su interior y proporcionando un área superficial suficiente para realizar una criodesecación eficaz.

30 Los frascos de material liofilizado se llevaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en solución con CRM₁₉₇ a una proporción de sacárido/proteína de 2:1. A la mezcla de sacárido/proteína, se le añadió tampón de fosfato de sodio 1 M a una fuerza iónica final de 0,2 M y a un pH de 7,5, después se añadió cianobromohidruro de sodio. La reacción se incubó a 23 °C durante 18 horas, seguido de una segunda incubación a 37 °C durante 72 horas. Después de las incubaciones con cianobromohidruro, la mezcla de reacción se diluyó con solución salina enfriada seguido de la adición de carbonato de sodio 1 M para ajustar la mezcla de reacción a un pH de 9,0. Los aldehídos que no reaccionaron se inactivaron por adición de borohidruro de sodio por incubación a 23 °C durante 3-6 horas.

35 La mezcla de reacción se diluyó 2 veces con solución salina y se transfirió a través de un prefiltro de 0,45-5 µm en un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 30x con tampón fosfato 0,15 M, pH 6, y 20x con solución salina. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

40 La solución con el conjugado se diluyó en solución salina 0,9% a una diana de 0,5 mg/ml y después se filtró estéril dentro de envases de concentrado de volumen final (CVF) en una campana de Clase 100. El conjugado se conservó a 2 - 8 °C.

Caracterización

Para perfilar la distribución de tamaño molecular relativa del conjugado se usó medio de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B).

45 La identidad del conjugado se confirmó mediante ensayo de transferencia en ranura usando antisueros específicos. Las concentraciones del sacárido y de la proteína se determinaron mediante ensayos de ácido úrico y Lowry, respectivamente. La proporción de sacárido con respecto a proteína en el complejo conjugado unido covalentemente se obtuvo mediante el cálculo:

$$\text{Proporción} = \frac{\text{sacárido } \mu\text{g/ml}}{\text{proteína } \mu\text{g/ml}}$$

El contenido de O-acetilo se midió mediante el procedimiento de Hestrin (Hestrin et. al., J. Biol. Chem. 1949, 180, pág. 249). La proporción de concentración de O-acetilo con respecto a concentración de sacárido total proporciona μ moles de O-acetilo por mg de sacárido.

Ejemplo 3

5 Preparación del polisacárido capsular de serotipo 3 de *S. Pneumoniae*

Preparación de bancos de células maestro y de trabajo

El serotipo 3 de *S. pneumoniae* se obtuvo del Dr. Robert Austrian, Universidad de Pensilvania, Filadelfia, Pensilvania. Para la preparación del sistema de banco de células véase el Ejemplo 1.

Fermentación y recogida

- 10 Para inocular frascos de semillas que contenían medio basado en soja se usaron los cultivos del banco de células de trabajo. Los frascos se incubaron a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin agitación hasta alcanzar las necesidades del cultivo. Se usó un frasco de semilla para inocular un fermentador de semillas que contenía medio basado en soja. Se mantuvo un pH de aproximadamente 7,0 con solución de carbonato de sodio estéril. Después de alcanzar la densidad óptica diana, se usó el fermentador de semillas para inocular el fermentador de producción que contenía medio basado en
- 15 soja. El pH se mantuvo con solución de carbonato de sodio estéril. La fermentación concluyó después de alcanzar el volumen de trabajo del fermentador. Al cultivo se le añadió una cantidad apropiada de desoxicolato sódico al 12% estéril para realizar la lisis de las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a las células. Después de la lisis, se enfrió el contenido del fermentador. El pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a aproximadamente 6,6 con ácido acético. El lisado se depuró por centrifugación de flujo continuo seguido de filtración en profundidad y
- 20 microfiltración a $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

Purificación

La purificación del polisacárido neumocócico consistió en diversas operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y etapas de filtración en profundidad. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente a menos que se especifique de otra manera.

- 25 El caldo depurado de los cultivos del fermentador del serotipo 31 de *S. pneumoniae* se concentró y se diafiltró usando un filtro de MWCO de 100 kDa. La diafiltración se consiguió usando tampón de fosfato sódico a pH neutro. La diafiltración eliminó del medio los componentes de bajo peso molecular de los biopolímeros de mayor peso molecular tales como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos.

- 30 Antes de la adición de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (BH) a la solución del polisacárido concentrada y diafiltrada se le añadió un volumen calculado de una solución de reserva de NaCl para proporcionar una concentración final de NaCl 0,25 M. Después, el polisacárido se precipitó añadiendo BH procedente de una solución de reserva para proporcionar una concentración final de BH al 1% (p/v). El precipitado polisacárido/HB se capturó sobre un filtro de profundidad y el filtrado se desechó. El precipitado con el polisacárido se volvió a disolver y se eluyó volviendo a poner en circulación una solución de cloruro de sodio a través del filtro de profundidad que
- 35 contenía el precipitado. Los filtros se aclararon después con una solución de cloruro de sodio adicional.

- A la solución con el polisacárido se le añadió yoduro de sodio (NaI) procedente de una solución de reserva de NaI para conseguir una concentración final del 0,5% para precipitar el BH. El precipitado se eliminó por filtración en profundidad. El filtrado contenía el polisacárido diana. El recipiente de precipitación y el filtro se aclararon con una solución de NaCl/NaI y el aclarado se combinó con la solución parcialmente purificada del polisacárido. El filtro se
- 40 eliminó. Después, el polisacárido se filtró a través de un filtro de $0,2\text{ }\mu\text{m}$.

La solución con el polisacárido se concentró sobre un ultrafiltro de MWCO de 30 kDa y se diafiltró con una solución de cloruro de sodio.

- La solución con el polisacárido purificado parcialmente se purificó adicionalmente por filtración a través de un filtro de profundidad impregnado con carbono activado. Después de la filtración, el filtro de carbono se aclaró con una
- 45 solución de cloruro de sodio. El aclarado se combinó con la solución con el polisacárido, que después se filtró a través de un filtro de $0,2\text{ }\mu\text{m}$.

La solución con el polisacárido se concentró sobre un ultrafiltro de MWCO de 30 kDa y se ajustó con un tampón de fosfato de sodio 1 M para conseguir una concentración final de fosfato de sodio de 0,025 M. El pH se comprobó y se ajustó a un pH de $7,0 \pm 0,2$.

- 50 La columna de cerámica de hidroxiapatita (HA) se equilibró con tampón de fosfato de sodio que contenía cloruro de sodio para obtener la conductividad apropiada ($<15\text{ }\mu\text{S}$). La solución con el polisacárido se cargó después sobre la columna. En estas condiciones, las impurezas se unieron a la resina y el polisacárido se recuperó en el flujo a través de la columna. La solución con el polisacárido se filtró a través de filtros en línea de $0,2\text{ }\mu\text{m}$ situados antes y después

de la columna.

La solución con el polisacárido se concentró usando un filtro de MWCO de 30 kDa. El concentrado de diafiltró después con API.

5 La solución diafiltrada con el polisacárido se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 μm en envases de acero inoxidable. Las muestras se extrajeron para el ensayo de liberación y el polisacárido purificado se conservó congelado a $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Caracterización

10 Los datos de RMN-1H concordaron con la estructura química por cesión de señales cedidas a los protones de la molécula de polisacárido. El espectro de RMN-1H mostró una serie de señales bien resueltas (protones del grupo metilo) para la cuantificación del grupo funcional O-acetilo en el polisacárido.

La identidad del polisacárido monovalente se confirmó por inmunoelectroforesis en contracorriente usando antisueros específicos.

15 Para calcular el peso molecular se usó cromatografía de filtración en gel de alto rendimiento acoplada con detectores de índice refractario y de dispersión multiángulo de luz láser (MALLS) junto con la concentración de la muestra.

Para perfilar la distribución de tamaño molecular relativa del polisacárido se usó medio de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B).

Ejemplo 4

Preparación del conjugado sacárido neumocócico de serotipo 3 - CRM₁₉₇

20 Activación y conjugación

Se descongelaron envases del sacárido de serotipo 3 purificado y se combinaron en un recipiente de reacción. Al recipiente se añadió API y ácido acético 2 M a una concentración final de 0,2 M y 2 mg/ml de sacárido. La temperatura de la solución se elevó a 85°C durante una hora para hidrolizar el polisacárido. La reacción se enfrió a $\leq 25^{\circ}\text{C}$ y se añadió cloruro de magnesio 1 M a una concentración final de 0,1 M. La oxidación se realizó en presencia de peryodato de sodio incubando durante 16-24 horas a 23°C .

La mezcla de la reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con API usando una membrana de MWCO de 100 K. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 μm .

30 Para la combinación, al sacárido activado se le añadió fosfato sódico 0,2 M, pH 7,0 a una concentración final de 10 mM y a un pH de 6,0-6,5. La proteína transportadora CRM₁₉₇ se mezcló con la solución de sacárido a una proporción de 2 g de sacárido por 1 g de CRM₁₉₇. La solución combinada de sacárido/proteína se cargó en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml con una carga diana de 50 ml, se congelaron en carcasa a -75°C y se liofilizaron.

35 Los frascos del material sacárido/proteína co-liofilizado se llevaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0, a una concentración de sacárido final de 20 mg/ml. El pH se ajustó a 6,5 y después se añadió un equivalente molar de cianoborohidruro de sodio de 0,5. La reacción se incubó a 37°C durante 48 horas. Después de la incubación con cianoborohidruro, la mezcla de reacción se diluyó con tampón frío de succinato 5 mM/solución salina al 0,9%. Los aldehídos que no habían reaccionado se inactivaron por la adición de borohidruro de sodio e incubación a 23°C durante 3-6 horas. La mezcla de reacción se transfirió a través de un prefiltro de 0,45-5 μm en un recipiente de retenido.

40 La mezcla de reacción se diafiltró 30x con tampón fosfato 0,1 M (pH 9), 20x con tampón fosfato 0,15 M (pH 6) y 20x con succinato 5 mM/solución salina al 0,9%. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 μm .

La solución con el conjugado se diluyó a una diana de sacárido de 0,5 mg/ml y después se filtró estéril dentro de envases de CVF en una campana de Clase 100. El conjugado se conservó a $2 - 8^{\circ}\text{C}$.

Caracterización

45 Para perfilar la distribución de tamaño molecular relativa del conjugado se usó medio de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B).

La identidad del conjugado se confirmó mediante ensayo de transferencia en ranura usando antisueros específicos. Las concentraciones del sacárido y de la proteína se determinaron mediante ensayos de ácido úrico y Lowry, respectivamente. La proporción de sacárido con respecto a proteína en el complejo conjugado unido covalentemente se obtuvo mediante el cálculo:

$$\text{Proporción} = \frac{\text{sacárido } \mu\text{g/ml}}{\text{proteína } \mu\text{g/ml}}$$

Ejemplo 5

Preparación del polisacárido capsular de serotipo 5 de *S. Pneumoniae*

El serotipo 5 de *S. pneumoniae* se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman de la Universidad del Estado de Nueva York, Brooklyn, Nueva York. Para la preparación del sistema de banco de células, véase el Ejemplo 1. Para la fermentación, recogida, purificación y caracterización del polisacárido, véase el Ejemplo 1.

Proceso de fermentación alternativo

Para inocular frascos de semilla que contenían un medio basado en soja y solución de NaHCO₃ estéril 10 mM, se usaron los cultivos del banco de células de trabajo. Los frascos se incubaron a 36 °C ± 2 °C sin agitación hasta alcanzar las necesidades del cultivo. Se usó un frasco de semilla para inocular un fermentador de semilla que contenía medio basado en soja y una solución de NaHCO₃ estéril 10 mM. Se mantuvo un pH de aproximadamente 7,0 con NaOH 3N. Después de alcanzar la densidad óptica diana, el fermentador de semilla se usó para inocular el fermentador de producción que contenía medio basado en soja con una concentración de NaHCO₃ 10 mM. El pH se mantuvo con NaOH 3N. La fermentación concluyó después del cese del crecimiento o cuando se alcanzó el volumen de trabajo del fermentador. Al cultivo se le añadió una cantidad apropiada de desoxicolato sódico al 12% estéril para realizar la lisis de las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a las células. Después de la lisis, el contenido del fermentador se mantuvo, con agitación, durante un intervalo de tiempo de entre 8 y 24 horas a una temperatura entre 7°C y 13°C para garantizar que se había producido la lisis celular completa y la liberación del polisacárido. La agitación durante este periodo de mantenimiento impidió que el sedimento del lisado se asentase en las paredes del fermentador y en la sonda del pH, permitiendo de esta manera mantener la integridad de la sonda del pH. Después, el pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a aproximadamente un pH de 4,5 con ácido acético al 50%. Después de un tiempo de mantenimiento sin agitación, durante un intervalo de tiempo entre 12 y 24 horas a una temperatura entre 15 °C y 25 °C, de la solución se extrajo una parte significativa de las proteínas previamente solubles como un precipitado sólido con una pequeña pérdida o degradación del polisacárido, que permaneció en solución. Después, la solución con el precipitado se depuró por centrifugación de flujo continuo seguido de filtración en profundidad y microfiltración a 0,45 μm.

Ejemplo 6

Preparación del conjugado sacárido neumocócico de serotipo 5 - CRM₁₉₇

Activación y conjugación

Se descongelaron envases del sacárido de serotipo 5 y se combinaron en un recipiente de reacción. Al recipiente se añadió acetato de sodio 0,1 M, pH 4,7 seguido de oxidación en presencia de peryodato de sodio por incubación durante 16-22 horas a 23 °C.

La mezcla de la reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x usando API y una membrana de MWCO de 100 K. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 μm.

El sacárido del serotipo 5 activado se combinó con CRM₁₉₇ a una proporción de 0,8:1. La solución combinada de sacárido/proteína se cargó en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml (carga diana 50 ml), se congelaron en carcasa a -75 °C y se co-liofilizaron.

Los frascos del material co-liofilizado se llevaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5, y se añadió cianoborohidruro de sodio. La reacción se incubó a 30 °C durante 72 horas, seguido de una segunda adición de cianoborohidruro y se incubó a 30 °C durante 20-28 horas.

Después de las incubaciones con cianoborohidruro, la mezcla de reacción se diluyó 2 veces con solución salina y se transfirió a través de un prefiltro de 0,45-5 μm dentro de un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 30x con tampón fosfato 0,01 M, pH 8, 20x con tampón fosfato 0,15 M, pH 6 y 20x con solución salina. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 μm.

La solución con el conjugado se diluyó a una diana de sacárido de 0,5 mg/ml y después se filtró estéril dentro de envases CVF en una campana de Clase 100. El conjugado se conservó a 2 - 8 °C.

Para la caracterización del conjugado, véase el Ejemplo 2.

Ejemplo 7

Preparación del polisacárido capsular de serotipo 6A de *S. Pneumoniae*

El serotipo 6A de *S. pneumoniae* se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman de la Universidad del Estado de Nueva York,

Brooklyn, Nueva York. Para la preparación del sistema de banco de células, véase el Ejemplo 1. Para la fermentación, recogida, purificación y caracterización del polisacárido, véase el Ejemplo 1, excepto que durante la purificación, se omitió la etapa de concentración MWCO de 30 kDa, antes de la etapa de cromatografía.

Ejemplo 8

5 Preparación del conjugado sacárido neumocócico de serotipo 6A - CRM₁₉₇

Activación y conjugación

10 El polisacárido del serotipo 6A es un polímero de alto peso molecular cuyo tamaño debe reducirse antes de realizar la oxidación. Se descongelaron envases del sacárido del serotipo 6A y se combinaron en un recipiente de reacción. Para la hidrólisis, al recipiente se le añadió ácido acético 2 M a una concentración final de 0,1 M durante 1,5 horas a 60 °C. La reacción se enfrió a 23 °C y la neutralización se realizó ajustando la mezcla de reacción con NaOH 1 M a pH 6. La oxidación en presencia de peryodato de sodio se realizó incubando a 23 °C durante 14-22 horas.

La mezcla de la reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con API usando una membrana de MWCO de 100 K. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

15 El serotipo 6A se combinó con sacarosa y se cargó en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml (carga diana 50 ml) y se congelaron en carcasa a -75 °C y se liofilizaron.

20 Los frascos del material liofilizado se llevaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una proporción de sacárido/proteína de 1:1. Después de la adición de cianoborohidruro de sodio, la mezcla de reacción se incubó a 23 °C durante 18 horas. Después de la incubación con cianoborohidruro, la mezcla de reacción se diluyó con solución salina enfriada. Los aldehídos que no habían reaccionado se inactivaron por adición de borohidruro de sodio incubando a 23 °C durante 3-20 horas.

La mezcla de reacción diluida se transfirió a través de un prefiltro de 5 µm en un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 10x con NaCl al 0,9% y 30x con NaCl tamponado con succinato. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

25 La solución con el conjugado se diluyó a una diana de sacárido de 0,5 mg/ml y después se filtró estéril dentro de envases CVF en una campana de Clase 100. El conjugado se conservó a 2 - 8 °C.

Para la caracterización del conjugado, véase el Ejemplo 2.

Ejemplo 9

Preparación del polisacárido capsular de serotipo 7F de *S. Pneumoniae*

30 El serotipo 7F de *S. pneumoniae* se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman de la Universidad del Estado de Nueva York, Brooklyn, Nueva York. Para la preparación del sistema de banco de células, véase el Ejemplo 1. Para un proceso de fermentación y de recogida alternativos, véase el proceso alternativo descrito en el Ejemplo 1.

Purificación

35 La purificación del polisacárido neumocócico consistió en diversas operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y etapas de filtración en profundidad. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente a menos que se especifique de otra manera.

El caldo depurado de los cultivos del fermentador del serotipo 7F de *S. pneumoniae* se concentró y se diafiltró usando un filtro de MWCO de 100 kDa. La diafiltración se consiguió usando tampón de fosfato sódico a pH neutro. La diafiltración eliminó del medio los componentes de bajo peso molecular de los biopolímeros de mayor peso molecular tales como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos.

40 El serotipo 7F no forma un precipitado con el BH. En cambio, añadiendo el BH de una solución de reserva a una concentración final de BH al 1%, se precipitaron impurezas procedentes de la solución concentrada y diafiltrada. El precipitado se capturó sobre un filtro de profundidad y el filtro se desechó. El polisacárido estaba incluido en el filtrado.

45 A la solución con el polisacárido se le añadió yoduro de sodio (NaI) procedente de una solución de reserva de NaI para conseguir una concentración final del 0,5% para precipitar el BH. El precipitado se eliminó por filtración en profundidad. El filtrado contenía el polisacárido diana. El recipiente de precipitación y el filtro se aclararon con una solución de NaCl/NaI y los aclarados se combinaron con la solución parcialmente purificada del polisacárido. El filtro se desechó. Después, el polisacárido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

50 La solución con el polisacárido se concentró sobre un ultrafiltro de MWCO de 30 kDa y se diafiltró con una solución de cloruro de sodio.

La solución con el polisacárido purificado parcialmente se purificó adicionalmente por filtración a través de un filtro de profundidad impregnado con carbono activado. Después de la filtración, el filtro de carbono se aclaró con una solución de cloruro de sodio. El aclarado se combinó con la solución con el polisacárido, que después se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

- 5 La solución con el polisacárido se concentró sobre un ultrafiltro de MWCO de 30 kDa y se ajustó con un tampón de fosfato de sodio 1 M para conseguir una concentración final de fosfato de sodio de 0,025 M. El pH se comprobó y se ajustó a un pH de $7,0 \pm 0,2$.

- 10 La columna de cerámica de hidroxiapatita (HA) se equilibró con tampón de fosfato de sodio que contenía cloruro de sodio para obtener la conductividad apropiada ($<15 \mu\text{S}$). La solución con el polisacárido se cargó después sobre la columna. En estas condiciones, las impurezas se unieron a la resina y el polisacárido se recuperó en el flujo a través de la columna. La solución con el polisacárido se filtró a través de filtros en línea de 0,2 µm situados antes y después de la columna.

La solución con el polisacárido se concentró usando un filtro de MWCO de 30 kDa. El concentrado se diafiltró después con Agua Para Inyección (API).

- 15 La solución de polisacárido diafiltrada se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm en envases de acero inoxidable. Las muestras se eliminaron para el ensayo de liberación y el polisacárido purificado se conservó a $2 \text{ }^\circ\text{C} - 8 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para la caracterización del polisacárido, véase el Ejemplo 3.

Ejemplo 10

- 20 **Preparación del conjugado sacárido neumocócico de serotipo 7F - CRM₁₉₇**

Activación y conjugación

La oxidación en presencia de peryodato de sodio se realizó incubando durante 16-24 horas a $23 \text{ }^\circ\text{C}$.

La mezcla de la reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con NaOAc 10 mM, pH 4,5 usando una membrana de MWCO de 100K. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

- 25 El serotipo 7F se cargó en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml (carga diana 50 ml) y se congelaron en carcasa a $-75 \text{ }^\circ\text{C}$ y se liofilizaron.

- 30 Los frascos liofilizados del serotipo 7F y CRM₁₉₇ se llevaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en DMSO a una proporción de sacárido/proteína de 1,5:1. Después de la adición de cianoborohidruro de sodio, la reacción se incubó a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 8-10 horas. Los aldehídos que no reaccionaron se inactivaron mediante la adición de borohidruro de sodio incubando a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 16 horas.

La mezcla de reacción se diluyó 10 veces con solución salina enfriada y se transfirió a través de un prefiltro de 5 µm dentro de un precipitado de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 10x con solución salina al 0,9% y 30x con solución salina tamponada con succinato. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

- 35 La solución con el conjugado se diluyó a una diana de sacárido de 0,5 mg/ml en solución salina al 0,9% y después se filtró estéril dentro de envases CVF en una campana de Clase 100. El conjugado se conservó a $2 - 8 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para la caracterización del conjugado, véase el Ejemplo 4.

Ejemplo 11

Preparación del polisacárido capsular de serotipo 19A de *S. Pneumoniae*

- 40 El serotipo 19A de *S. Pneumoniae* se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman de la Universidad del Estado de Nueva York, Brooklyn, Nueva York. Para la preparación del sistema de banco de células, véase el Ejemplo 1. Para la fermentación, recogida y purificación del polisacárido, véase el Ejemplo 7. Para la caracterización, véase el Ejemplo 3.

Ejemplo 12

Preparación del conjugado sacárido neumocócico de serotipo 19A - CRM₁₉₇

- 45 Activación y conjugación

Se descongelaron envases del sacárido de serotipo 19A y se combinaron en un recipiente de reacción. Se añadió acetato de sodio a 10 mM (pH 5,0) y la oxidación se realizó en presencia de peryodato de sodio incubando durante

16-24 horas a 23 °C.

La mezcla de la reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con acetato 10 mM, pH 5,0, usando una membrana de MWCO de 100 K. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

5 El sacárido activado se combinó con sacarosa seguido de la adición de CRM₁₉₇. La mezcla de sacárido 19A activado y CRM₁₉₇ (proporción de 8:1) se cargó en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml (carga diana 50 ml), se congelaron en carcasa a -75 °C y se co-liofilizaron.

10 Los frascos del material liofilizado se llevaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en DMSO y a la mezcla de sacárido/proteína se le añadió cianoborohidruro de sodio (100 mg/ml) La reacción se incubó a 23 °C durante 15 horas. Después de la incubación con cianoborohidruro, los aldehídos que no reaccionaron se inactivaron por adición de borohidruro de sodio incubando a 23° C durante 3-20 horas.

La mezcla de reacción se diluyó 10 veces con solución salina enfriada y se transfirió a través de un prefiltro de 5 µm dentro de un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 10x con NaCl al 0,9%, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y 30x con diafiltración usando tampón succinato 5mM/NaCl al 0,9%, pH 6. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

15 La solución con el conjugado se diluyó a una diana de 0,5 mg/ml usando succinato 5mM/solución salina al 0,9%, y después se filtró estéril dentro de envases CVF en una campana de Clase 100. El conjugado se conservó a 2 - 8 °C.

Para la caracterización del conjugado, véase el Ejemplo 4.

Ejemplo 13

Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* de serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F

20 Preparación del cultivo de semilla de *S. Pneumoniae*

Los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. Pneumoniae* se obtuvieron del Dr. Gerald Schiffman, Universidad del Estado de Nueva York, Brooklyn, Nueva York. El serotipo 14 de *S. Pneumoniae* se obtuvo de cepa 6314 de la ATCC.

25 Individualmente, se usó un vial de cada uno de los serotipos deseados de *Streptococcus pneumoniae* para comenzar un lote de fermentación. Dos frascos, que contenían un medio basado en soja y rojo fenol, se ajustaron a un intervalo de pH de 7,4 ± 0,2 usando carbonato de sodio y después a los frascos se añadió el volumen necesario de una solución de dextrosa al 50%/sulfato de magnesio al 1%. Los dos frascos se inocularon en diferentes cantidades de semilla. Los frascos se incubaron a 36 °C ± 2 °C hasta que el medio se volvió amarillo. Después de la incubación, las muestras se eliminaron de cada frasco y se realizaron ensayos para determinar la densidad óptica (DO) (de 0,3 a 0,9) y el pH (4,6 a 5,5). Uno de los dos frascos se seleccionó para la inoculación del fermentador de semilla.

35 El medio basado en soja se transfirió al fermentador de semilla y se esterilizó. Después, al fermentador se añadió un volumen de una solución de dextrosa al 50%/sulfato de magnesio al 1%. Se supervisó y se controló el pH y la agitación del fermentador de semilla (pH de 6,7 a 7,4). La temperatura se mantuvo a 36 °C ± 2 °C. El inóculo de semilla (frasco) se conectó asépticamente al fermentador de semilla y se transfirió el inóculo. El fermentador se mantuvo a un pH controlado y las muestras se extrajeron periódicamente y se ensayaron para determinar la DO y el pH. Cuando se alcanzó la DO deseada de 0,5 a 600 nm, el fermentador intermedio se inoculó con el caldo de fermentación desde el fermentador de semilla.

40 El medio basado en soja se transfirió al fermentador intermedio y se esterilizó. Después, al fermentador se añadió un volumen de solución de dextrosa al 50%/sulfato de magnesio al 1%. El pH y la agitación del fermentador intermedio se controlaron y supervisaron (pH de 6,7 a 7,4). La temperatura se mantuvo a 36°C ± 2°C. El contenido del fermentador de semillas se transfirió al fermentador intermedio. El fermentador se mantuvo en control de pH y las muestras se extrajeron periódicamente y se realizaron ensayos para determinar la DO y el pH. Cuando se alcanzó la DO deseada de 0,5 a 600 nm, el fermentador de producción se inoculó con el caldo de fermentación desde el fermentador intermedio.

45 El medio basado en soja se transfirió al fermentador de producción y se esterilizó. Después al fermentador se añadió un volumen de una solución de dextrosa al 50%/sulfato de magnesio al 1%. El pH y la agitación del fermentador intermedio se controlaron y supervisaron (pH de 6,7 a 7,4). La temperatura se mantuvo a 36 °C ± 2 °C. El contenido del fermentador de semilla se transfirió al fermentador intermedio. El fermentador se mantuvo en control de pH y las muestras se extrajeron periódicamente y se realizaron ensayos para determinar la DO y el pH, hasta que se completó la fermentación.

50 Al fermentador se añadió desoxicolato de sodio a una concentración final de aproximadamente 0,12% p/v. El cultivo se mezcló durante un mínimo de treinta minutos y el valor de ajuste de la temperatura se redujo a 10 °C. El cultivo se

incubó durante una noche y tras confirmarse la inactivación, el pH del cultivo se ajustó a entre 6,6 y 6,8, si fuera necesario, con ácido acético al 50%. La temperatura del fermentador se aumentó a $20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ y el contenido se transfirió a un depósito de retención de clarificación.

5 El contenido del depósito de retención de clarificación (incluyendo los residuos celulares) se procesó a través de una centrifugadora a un caudal entre 25 y 600 litros por hora (excepto el Serotipo 4, en el que los residuos celulares se desecharon y el caudal se estrechó a entre 25 y 250 litros por hora). Las muestras del sobrenadante se extrajeron y se realizaron ensayos para determinar la DO. La DO deseada durante la centrifugación fue $\leq 0,15$.

10 Inicialmente, el sobrenadante recirculó a través de un ensamblaje de filtro de profundidad hasta que se consiguió una DO de $0,05 \pm 0,03$. Después el sobrenadante se hizo pasar a través de un ensamblaje de filtro de profundidad y a través de un filtro de membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ hasta el depósito de retención de filtrado.

Posteriormente, el producto se transfirió a través de conductos cerrados al área de purificación para el procesamiento.

Todas las operaciones anteriores (centrifugación, filtración y transferencia) se realizaron entre 10 °C a 30 °C .

15 Para un proceso de fermentación y de recogida alternativo para los serotipos 4 y 6B, véase el proceso alternativo descrito en el Ejemplo 1.

Purificación

La purificación de cada polisacárido neumocócico consistió en diversas operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna, y etapas de filtración en profundidad. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente salvo que se especifique de otra manera.

20 El caldo depurado de los cultivos del fermentador del serotipo de *S. pneumoniae* deseado se concentró y se diafiltró usando un filtro de MWCO de 100 kDa. La diafiltración se consiguió usando un tampón con fosfato de sodio a un pH $< 9,0$. La diafiltración eliminó del medio los componentes de bajo peso molecular de los biopolímeros de mayor peso molecular tales como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos.

25 El polisacárido se precipitó de la solución concentrada y diafiltrada añadiendo BH de una solución de reserva para proporcionar una concentración final de BH del 1% (p/v) (salvo el serotipo 23F que tuvo una concentración final del 2,5%).

30 El precipitado polisacárido/BH se capturó sobre un filtro de profundidad y el filtrado se desechó (Observación: el serotipo 14 no precipita; por lo tanto el filtrado se conservó). El precipitado con el polisacárido se resolubilizó y se eluyó volviendo a hacer circular una solución de cloruro de sodio a través de un filtro de profundidad que contenía el precipitado. Después los filtros se aclararon con una solución de cloruro de sodio adicional.

Se añadió yoduro de sodio (NaI) a la solución con el polisacárido procedente de una solución de reserva de NaI para conseguir una concentración final del 0,5% para precipitar el BH (excepto para el serotipo 6B, que tuvo una concentración final del 0,25%). El precipitado se eliminó por filtración en profundidad. El filtrado contenía el polisacárido diana. El filtrado se desechó. El polisacárido se filtro después a través de un filtro de $0,2\ \mu\text{m}$.

35 La solución con el polisacárido se concentró sobre un ultrafiltro de MWCO de 30 kDa y se diafiltró con una solución de cloruro de sodio.

40 La solución con el polisacárido parcialmente purificada se purificó adicionalmente por filtración a través de un filtro de profundidad impregnado con carbón activado. Después de la filtración, el filtro de carbón se aclaró con una solución de cloruro de sodio. El aclarado se combinó con la solución con el polisacárido, que después se filtró a través de un filtro de $0,2\ \mu\text{m}$.

La solución con el polisacárido se concentró sobre un ultrafiltro de MWCO de 30 kDa y el filtro se aclaró con una solución de cloruro de sodio. El pH se comprobó y se ajustó a $7,0 \pm 0,3$.

45 La columna de hidroxiapatita (HA) de cerámica se equilibró con tampón fosfato de sodio que contenía cloruro de sodio hasta un pH de $7,0 \pm 0,3$ y la conductividad fue de $26 \pm 4\ \mu\text{S}$. La solución con el polisacárido se cargó después sobre la columna. En estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y el polisacárido se recuperaron en el flujo a través de la columna. La solución con el polisacárido se filtró a través de un filtro de $0,2\ \mu\text{m}$.

La solución con el polisacárido se concentró usando un filtro de MWCO de 30 kDa. El concentrado después se diafiltró con API hasta que la conductividad fue $< 15\ \mu\text{S}$.

50 La solución con el polisacárido diafiltrado se filtró a través de un filtro de membrana de $0,2\ \mu\text{m}$ en envases de volumen y se conservaron a $2\text{-}8\text{ °C}$.

Ejemplo 14**Preparación de los conjugados sacárido neumocócico - CRM₁₉₇ para los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F**Proceso de activación

- 5 Como se describe en este ejemplo, los sacáridos de diferentes serotipos siguieron rutas diferentes para la activación (hidrólisis o no hidrólisis antes de activación) y la conjugación (reacciones acuosas o con DMSO).

El polisacárido se transfirió desde los envases de volumen al recipiente del reactor. Después, el polisacárido se diluyó en API y fosfato de sodio a un intervalo de concentración final de 1,6 - 2,4 mg/ml.

Etapa 1.

- 10 Para los serotipos 6B, 9V, 14, 19F y 23F, el pH se ajustó a $6,0 \pm 0,3$.

Para el serotipo 4, se añadió ácido clorhídrico (concentración de ácido final de 0,01 M) y la solución se incubó durante 25 - 35 minutos a 45 ± 2 °C. La hidrólisis se detuvo enfriando a 21 - 25 °C y añadiendo fosfato sódico 1 M a una diana de pH $6,7 \pm 0,2$. Se realizó un ensayo en proceso par confirmar un nivel apropiado de despiruvilación.

- 15 Para el serotipo 18C se añadió ácido acético glacial (concentración de ácido final de 0,2 M) y la solución se incubó durante 205 - 215 minutos a 94 ± 2 °C. Después la temperatura disminuyó a 21 - 25 °C y se añadió fosfato sódico 1 - 2 M a una diana de pH $6,8 \pm 0,2$.

Etapa 2: reacción con peryodato

- 20 Los equivalentes molares de peryodato de sodio necesarios para la activación del sacárido neumocócico se determinaron usando el contenido de sacárido total (excepto para el serotipo 4). Para el serotipo 4 se usó una proporción de 0,8-1,2 moles de peryodato de sodio por mol de sacárido. Mezclando cuidadosamente, la reacción de oxidación se permitió continuar entre 16 a 20 horas a 21 - 25°C para todos los serotipos excepto para el 19F para el cual la temperatura era ≤ 15 °C.

Etapa 3: Ultradiafiltración

- 25 El sacárido oxidado se concentró y se diafiltró con API (tampón de fosfato de sodio 0,01 M pH 6,0 para el serotipo 19F) sobre un ultrafiltro de MWCO de 100 kDa (ultrafiltro de 5 kDa para el serotipo 18C). El filtrado se desechó y el retenido se filtro a través de un filtro de 0,22 μm .

Etapa 4: Liofilización

- 30 Para los serotipos 4, 9V y 14 el sacárido concentrado se mezcló con proteína la transportadora CRM₁₉₇, se cargó en frascos de vidrio, se congelaron en carcasa y se conservaron a ≤ -65 °C. El sacárido concentrado/CRM₁₉₇ congelado se liofilizó y después se conservó a -25 °C ± 5 °C.

Para los serotipos 6B, 19F y 23F, se añadió una cantidad específica de sacarosa que se calculó para conseguir una concentración de sacarosa del $5\% \pm 3\%$ en la mezcla de reacción de conjugación. El serotipo 18C no necesitó la adición de sacarosa. El sacárido concentrado se cargó después en frascos de vidrio, se congelaron en carcasa y se conservaron a ≤ -65 °C. El sacárido concentrado congelado se liofilizó y después se conservó a -25 °C ± 5 °C.

- 35 Proceso de conjugación

Se usaron dos procesos de conjugación: conjugación acuosa para los serotipos 4, 9V, 14 y 18C, y conjugación con DMSO para los serotipos 6B, 19F y 23F.

Conjugación acuosa*Etapa 1: Disolución*

- 40 Para los serotipos 4, 9V y 14, la mezcla sacárido activado-CRM₁₉₇ liofilizada se descongeló y se equilibró a temperatura ambiente. La mezcla sacárido activado-CRM₁₉₇ liofilizada se reconstituyó después en tampón de fosfato de sodio 0,1 M a una proporción típica de:

- 1 l de tampón por 16 - 24 g de sacárido para los serotipos 4 y 9V
- 1 l de tampón por 6 - 10 g de sacárido para el serotipo 14

- 45 La mezcla de reacción se incubó a 37 °C ± 2 °C hasta la disolución total para el serotipo 9V y a 23 °C ± 2 °C para los serotipos 4 y 14.

Para el serotipo 18C, el sacárido liofilizado se reconstituyó en una solución de CRM₁₉₇ en fosfato sódico dibásico 1 M a una proporción típica de 0,11 l de fosfato sódico por 1 l de solución CRM₁₉₇. La mezcla de reacción (concentración de sacárido 8-12 g/l) se incubó a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la disolución total.

En esta fase, el pH se ensayó como un control de proceso interno.

5 *Etapa 2: Reacción de conjugación*

Para los serotipos 4 y 9V la reacción de conjugación se inició añadiendo la solución de cianoborohidruro de sodio (100 mg/ml) para conseguir 1,0-1,4 moles de cianoborohidruro de sodio por mol de sacárido. La mezcla de reacción se incubó durante 44 - 52 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después, la temperatura se redujo a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y al reactor se añadió cloruro de sodio al 0,9%. Se añadió solución de borohidruro de sodio (100 mg/ml) para conseguir 1,8 - 2,2 equivalentes molares de bromohidruro de sodio por mol de sacárido. La mezcla se incubó durante 3 - 6 horas a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla se diluyó con cloruro de sodio al 0,9% y se aclaró el reactor. La mezcla de conjugación diluida se filtró usando un prefiltro de 1,2 μm en un recipiente de retención.

Para los serotipos 14 y 18C, la reacción de conjugación se inició añadiendo la solución de cianoborohidruro (100 mg/ml) para conseguir 1,0-1,4 moles de cianoborohidruro de sodio por mol de sacárido. La mezcla de reacción se incubó durante 12 - 24 horas a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. La temperatura se aumentó a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la reacción se incubó durante 72 - 96 horas. Después la temperatura se redujo a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y al reactor se añadió cloruro de sodio al 0,9%. Se añadió solución de borohidruro de sodio (100 mg/ml) para conseguir 1,8 - 2,2 equivalentes molares de borohidruro de sodio por mol de sacárido. La mezcla se incubó durante 3 - 6 horas a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla se diluyó con cloruro de sodio al 0,9% y el reactor se aclaró. La mezcla de conjugación diluida se filtró después usando un prefiltro de 1,2 μm en un recipiente de retención.

15 *Etapa 3: Ultrafiltración de 100 kDa*

La mezcla de conjugación diluida se concentró y se diafiltró sobre un ultrafiltro de MWCO de 100 kDa bien con un mínimo de 15 volúmenes (serotipo 4) o bien con 40 volúmenes (serotipos 9V, 14 y 18C) de cloruro de sodio al 0,9%.

El filtrado se desechó.

25 Para el serotipo 4 el retenido se filtró a través de un filtro 0,45 μm .

En esta etapa se realizó un control de proceso interno (contenido de sacárido).

Etapa 4: Purificación en columna de HA.

Esta etapa sólo se realizó para el conjugado del serotipo 4.

30 La columna de HA se neutralizó primero usando tampón de fosfato de sodio 0,5 M (pH $7,0 \pm 0,3$) y después se equilibró con cloruro de sodio al 0,9%. El retenido filtrado (serotipo 4) se cargó sobre la columna a un caudal de 1,0 Umin. La columna se lavó con cloruro de sodio al 0,9% a un caudal de $\leq 2,0$ Umin. El producto se eluyó después con tampón de fosfato de sodio 0,5 M a un caudal de $\leq 2,0$ Umin.

La fracción de HA se concentró después y se diafiltró sobre una membrana de MWCO de 100 kDa con un mínimo de 20 volúmenes de cloruro de sodio 0,9%. El filtrado se desechó.

35 *Etapa 5: Filtración estéril.*

Después de la diafiltración MWCO de 100 kDa el retenido se filtró a través de un filtro de 0,22 μm . En el producto filtrado se realizaron controles de proceso interno (contenido de sacárido, proteína libre, sacárido libre y cianuro). Sobre el retenido filtrado se realizaron controles de proceso interno para determinar si para cumplir con las dianas de CVF eran necesarias concentración, diafiltración y/o dilución adicionales. En muestras de CVF, se repitieron estos ensayos y ensayos adicionales.

Según sea necesario, el conjugado filtrado se diluye con cloruro de sodio al 0,9% para conseguir una concentración final de menos de 0,55 g/l. En esta fase se realizaron ensayos de liberación para determinar el contenido de sacárido, contenido de proteína y la proporción de sacárido: proteína.

45 Finalmente, el conjugado se filtró (0,22 μm) y se cargó en cartuchos de acero inoxidable de 10 l a una cantidad típica de 2,64 g/cartucho. En esta fase, como controles de proceso interno se realizó la determinación de la producción, contenido de sacárido, contenido de proteína, pH, proporción de sacárido:proteína y contenido de lisina. En esta fase se realizó un ensayo de liberación (determinación del aspecto, proteína libre, sacárido libre, endotoxina, tamaño molecular, cianuro residual, identidad del sacárido, identidad de CRM₁₉₇).

Conjugación con DMSO*Etapa I: Disolución*

5 Los serotipos 6B, 19F, 23F del sacárido activado liofilizado y la proteína transportadora CRM₁₉₇ liofilizada se equilibraron a temperatura ambiente y se reconstituyeron en DMSO. La concentración de la disolución típicamente variaba de 2-3 gramos de sacárido (2-2,5 g proteína) por litro de DMSO.

Etapa II: Reacción de conjugación

El sacárido activado y la proteína transportadora CRM₁₉₇ se mezclaron durante 60 - 75 minutos a $23 \text{ }^{\circ} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a una proporción en el intervalo de 0,6 g - 1,0 g de sacárido/g de CRM₁₉₇ para los serotipos 6B y 19F o de 1,2 a 1,8 g de sacárido/g de CRM₁₉₇ para el serotipo 23F.

10 La reacción de conjugación se inició añadiendo la solución de cianoborohidruro de sodio (100 mg/ml) a una proporción de 0,8 - 1,2 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio a un mol de sacárido activado. Se añadió API a la mezcla de reacción a una diana deL 1% (v/v) y la mezcla se incubó durante más de 40 horas a $23 \text{ }^{\circ} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

15 A la reacción se añadió solución de borohidruro de sodio, 100 mg/ml (1,8 - 2,2 equivalentes molares típicos de borohidruro de sodio por mol de sacárido activado) y API (diana al 5% v/v) y la mezcla se incubó durante 3 - 6 horas a $23 \text{ }^{\circ} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Este procedimiento redujo todos los aldehídos que no habían reaccionado presentes en los sacáridos. Después la mezcla de reacción se transfirió a un tanque de dilución que contenía cloruro de sodio al 0,9% a $< 15^{\circ}\text{C}$.

Etapa III: Ultrafiltración de 100 kDa

20 La mezcla del conjugado diluido se filtró a través de un filtro de 1,2 μm y se concentró y se diafiltró sobre una membrana de MWCO 100 kDa con un mínimo de 15 volúmenes de cloruro de sodio al 0,9% (para el serotipo 23 F se usó tampón de fosfato de sodio 0,01 M/NaCl 0,05 M). El filtrado se desechó. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,45 μm . En esta fase se tomó una muestra para determinar el contenido de sacárido mediante un proceso interno.

Etapa IV: Purificación en columna DEAE

Esta etapa solo se realizó para el serotipo 23F.

25 La columna DEAE se equilibró con tampón de fosfato de sodio 0,01 M/cloruro de sodio 0,5 M. El retenido filtrado (serotipo 23F) se cargó sobre la columna y se lavó con tampón fosfato de sodio 0,01 M/cloruro de sodio 0,5 M. Después la columna se lavó con tampón de fosfato de sodio 0,01 M/NaCl al 0,9%. Después el producto se eluyó con tampón de fosfato de sodio 0,01 M/cloruro de sodio 0,5 M.

Etapa V: Ultrafiltración con 100 kDa

30 El retenido de 6B y 19F se concentró y se diafiltró con al menos 30 volúmenes de cloruro de sodio al 0,9%. El filtrado se desechó.

El eluado del serotipo 23F se concentró y se diafiltró con un mínimo de 20 volúmenes de cloruro de sodio al 0,9%. El filtrado se desechó.

Etapa VI: filtración estéril

35 Después de la diafiltración MWCO de 100 kDa el retenido se filtró a través de un filtro de 0,22 μm . En el producto filtrado se realizaron controles de proceso interno (contenido de sacárido, proteína libre, sacárido libre, DMSO residual y cianuro residual). Sobre el retenido filtrado se realizaron controles de proceso interno para determinar si para cumplir con las dianas de CVF eran necesarias concentración, diafiltración y/o dilución adicionales. En muestras de CVF, se repitieron estos ensayos y ensayos adicionales.

40 Según sea necesario, el conjugado filtrado se diluye con cloruro de sodio al 0,9% para conseguir una concentración final de menos de 0,55 g/l. En esta fase se realizaron ensayos de liberación para determinar el contenido de sacárido, contenido de proteína y la proporción de sacárido: proteína.

45 Finalmente, el conjugado se filtró (0,22 μm) y se cargó en cartuchos de acero inoxidable de 10 l a una cantidad de 2,64 g/cartucho. En esta fase, como controles de proceso interno, se realizó la determinación de la producción, contenido de sacárido, contenido de proteína, pH, proporción de sacárido:proteína y contenido de lisina. En esta fase se realizó un ensayo de liberación (determinación del aspecto, proteína libre, sacárido libre, endotoxina, tamaño molecular, cianuro residual, DMSO residual, identidad del sacárido e identidad de CRM₁₉₇).

Ejemplo 15**Formulación de una vacuna conjugada neumocócica multivalente**

Los concentrados de volumen final de los 13 conjugados contienen cloruro de sodio al 0,85%. Los concentrados de volumen del tipo 3, 6A, 7F y 19A también contienen tampón de succinato de sodio 5 mM a un pH de 5,8. Los volúmenes necesarios de los concentrados de volumen se calcularon basándose en el volumen del lote y las concentraciones de volumen de sacárido. Después de añadir al recipiente de formulación, previamente etiquetado, el 80% de la (solución salina fisiológica) de cloruro de sodio al 0,85% y la cantidad necesaria de tampón succinato, se añadieron los concentrados de volumen. Después, la preparación se filtró estéril a través de una membrana de 0,22 µm en un segundo envase usando una unidad de filtro de membrana Durapore de Milipore. El primer envase se lavó con el restante 20% de cloruro de sodio al 0,85% en la disolución se pasó a través del mismo filtro y se recogió en el segundo envase. El volumen formulado se mezcló cuidadosamente durante y después de la adición de fosfato de aluminio a granel. El pH se comprobó y se ajustó si fuera necesario. El producto de volumen formulado se conservó a 2-8°C.

El producto de volumen formulado se cargó en jeringas de vidrio de borosilicato de Tipo 1 obtenidas en Becton Dickinson. La vacuna se controló a intervalos regulares para determinar la turbidez con objeto de garantizar la uniformidad de la operación de carga. La vacuna cargada (Producto Final) se conservó a 2-8 °C.

Ejemplo 16**Inmunogenicidad de la vacuna conjugada 13-valente**

Hasta ahora, los estudios preclínicos realizados sobre la vacuna 13vPnC se han realizado en conejos. Se diseñaron los estudios N° HT01-0021 y N° HT01-0036 para examinar independientemente el efecto de la conjugación química de polisacáridos capsulares (PSs) de *S. pneumoniae* con CRM₁₉₇ y el efecto del adyuvante fosfato de aluminio (AIPO₄) sobre la respuesta inmunitaria contra la vacuna 13vPnC en conejos. Estos efectos se caracterizaron por ensayo ELISA específico de antígenos para las concentraciones de IgG en suero y para la función de anticuerpos por ensayo opsonofagocítico (OPA).

Estudio N° HT01-0021

El estudio N° HT01-002 examinó la capacidad de la vacuna 13vPnC con el adyuvante AIPO₄ para suscitar respuestas inmunitarias específicas de serotipo. Los serotipos neumocócicos representados en la vacuna 13vPnC incluyen los tipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. Objetivos secundarios incluyeron una evaluación de la cinética y de la duración de la respuesta frente a los anticuerpos. Se inmunizaron conejos Blancos de Nueva Zelanda (NZ) por vía intramuscular la semana 0 y la semana 2 con la dosis clínica humana planificada de cada polisacárido (2 µg de cada PS, excepto 4 µg para el serotipo 6B) formulada con o sin AIPO₄ (100 µg/dosis). Se recogieron sueros a diversos puntos de tiempo. La IgG específica de serotipo se midió por ELISA y la actividad funcional se evaluó por OPA.

La Tabla 4 muestra la titulación media geométrica (TMG) conseguida en muestras de suero agrupadas, después de dos dosis de la vacuna 13vPnC. Se usó una proporción de las TMG de IgG para comparar las respuestas de la semana 4 a la semana 0. Estos datos demuestran que la inclusión de AIPO₄ en la formulación de 13vPnC suscitó niveles más altos de anticuerpos IgG en comparación con la misma vacuna sin adyuvante. Aunque las respuestas frente a anticuerpos fueron superiores cuando se incluyó AIPO₄ en la formulación, estos aumentos no fueron estadísticamente significativos.

También se evaluaron respuestas de anticuerpos funcionales en conejos después de inmunización con las dos formulaciones de 13vPnC (Tabla 5). Cuando se compararon las formulaciones de las vacunas con o sin adyuvante, mediante ensayo OPA se observaron las TMG más elevadas en el grupo de tratamiento con la vacuna 13vPnC + AIPO₄. En los dos grupos, las titulaciones mediante ensayo OPA se detectaron en los grupos de suero de la semana 4 en todos los serotipos de la vacuna. Para la mayoría de los serotipos, las titulaciones mediante ensayo OPA medidas a la semana 4 fueron al menos 4 veces mayores que las de la semana 0 (línea basal).

Se evaluaron las respuestas cinéticas para cada uno de los serotipos de la vacuna 13vPnC de los grupos de suero de los dos grupos de tratamiento. Las titulaciones de IgG para cada serotipo se midieron de extracciones de sangre a la semana 0 y a las semanas 1, 2, 3, 4, 8, 12, 26 y 39 y después se compararon. Con la excepción del serotipo 1, las respuestas de anticuerpos en animales que recibieron la vacuna con adyuvante fueron superiores a las que recibieron la vacuna sin adyuvante y alcanzaron el máximo a la semana 2 del programa de inmunización (datos no mostrados).

Globalmente, los datos indican que la vacuna 13vPnC formulada con fosfato de aluminio es inmunogénica en conejos, suscitando respuestas de anticuerpos sustanciales contra los polisacáridos capsulares neumocócicos contenidos en la vacuna y estas respuestas están asociadas con una actividad funcional. Las respuestas observadas para los siete serotipos núcleo después de inmunización con 13vPnC + AIPO₄ coincidieron con las respuestas históricas de conejos con respecto a la formulación heptavalente.

a. Las TGM de sueros agrupados consisten en los mismos volúmenes de suero de cada conejo individual dentro de un grupo.

b. Estadísticamente diferente ($p = 0,022$) del grupo de tratamiento sin ALPO₄.

5

Tabla 4: Respuestas inmunes de IgG de conejo (TGM) después de inmunización con dos dosis de glucoconjugado neumocócico 13-valente

Serotipo	Diluyente con ALPO ₄ ^a			13vPnC		13vPnC + ALPO ₄ ^a			
	Semana 0	Semana 4	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 0	^a Semana 4 (IC 95%)	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción Sem 4:Sem 0
1	<100	<100	1,0	50	5,926 (2,758-2,733)	119	50	11,091 (5,327-23,093)	222
3	<100	<100	1,0	50	6,647 (2,773-15,932)	133	58	16,443 (7,096-38,106)	284
4	<100	<100	1,0	50	13,554 (8,031-22,875)	271	50	29,183 (15,342-55,508)	584
5	134	<100	0,4	50	5,859 (2,450-14,009)	117	50	16,714 (6,959-40,140)	334
6A	141	<100	0,4	74	22,415 (11,987-41,914)	303	83	63,734 (21,141-192,146)	768
6B	<100	<100	1,0	57	8,108 (3,564-18,444)	142	54	23,505 (11,286-48,955)	435
7F	3,859	579	0,2	171	43,591 (26,931-70,557)	444	143	84,888 (46,445-155,151)	496
9V	289	995	3,4	205	15,780 (7,193-34,616)	125	208	43,331 ^b (23,256-71,510)	217
14	437	177	0,4	61	6,906 (3,416-13,962)	113	70	16,076 (9,649-26,785)	322
18C	<100	<100	1,0	50	21,283 (15,770-28,725)	426	50	35,040 (24,708-49,692)	701
19A	<100	<100	1,0	121	113,599 (54,518-236,707)	939	144	280,976 (119,587-660,167)	1.951

(continuación)

Serotipo	Diluyente con ALPO ₄ ^a			13vPnC		13vPnC + ALPO ₄ ^a			
	Semana 0	Semana 4	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 0	^a Semana 4 (IC 95%)	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción Sem 4:Sem 0
19F	<100	<100	1,0	50	14,365 (7,346- 28,090)	287	50	24,912 (9,243- 67,141)	498
23F	<100	<100	1,0	50	5,323 (1,894- 14,962)	106	50	15,041 (4,711- 48,018)	301

a. Las TMG de sueros agrupados consisten en los mismos volúmenes de suero de cada conejo individual dentro de un grupo

b. Estadísticamente diferente (p=0.022) del grupo de tratamiento sin ALPO₄

Tabla 5: TMG por OPA de *S. pneumoniae* para grupos de suero de conejos de NZ después de inmunización con dos dosis de glucoconjugado neumocócico 13-valente

Serotipo	13vPnC ^a			13vPnC + ALPO ₄ ^a		
	Semana 0	Semana 4	Proporción Sem 4: Sem 0	Semana 0	Semana 4	Proporción Sem 4: Sem 0
1	<8	64	16	<8	64	16
3	<8	8	2	<8	16	4
4	<8	16	4	<8	32	8
5	<8	128	32	<8	512	128
6A	8	128	16	8	512	64
6B	<8	256	64	8	1,024	128
7F	8	64	8	8	128	16
9V	8	64	8	8	128	16
14	16	32	2	16	32	2
18 C	8	256	32	<8	256	64
19A	<8	256	64	<8	1,024	256
19F	<8	128	32	<8	512	128
23F	8	64	8	<8	256	64

A: Los grupos consisten en los mismos volúmenes de suero de conejos individuales dentro de un grupo de tratamiento (n = 12)

5

Estudio N° HT01-0036

El estudio N° HT01-0036 comparó las respuestas inmunitarias de los conejos con respecto a los polisacáridos (PS) contenidos en la vacuna, después de inmunización con la vacuna 13vPnC con o sin conjugación con la proteína CRM₁₉₇. Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda por vía intramuscular la semana 0 y la semana 2 con una dosis de 2,2 µg de cada PS (excepto 4,4 µg para el serotipo 6B). Los animales recibieron una de las tres preparaciones de vacuna: (a) 13vPnC (PS directamente conjugado con CRM₁₉₇), (b) 13vPnPS, (sin PS) o (c)

10

13vPnPS + CRM₁₉₇ (sin PS mezclado con CRM₁₉₇). Todas las preparaciones de vacuna contenían AIPO₄ como adyuvante a 125 µg/dosis.

5 Las respuestas inmunes específicas de serotipo para todas las preparaciones de vacuna se evaluaron en un ensayo ELISA para IgG y ensayo OPA mediado por complemento para medir los anticuerpos funcionales. Las respuestas inmunes se compararon entre los grupos de tratamiento.

10 La Tabla 6 representa los datos TMG obtenidos de extracciones de sangre la semana 4 analizadas en los ensayos ELISA para IgG específicos de antígeno. Análisis adicionales muestran la proporción de los valores TMG de la semana 4 con respecto a la semana 0. Los datos indican que la preparación de vacuna conjugada suscita mayores titulaciones de IgG en suero que la vacuna sin PS o sin PS + CRM₁₉₇. Con la excepción del tipo 14 de *S. pneumoniae*, la vacuna 13vPnC fue capaz de inducir anticuerpos funcionales con respecto a las cepas representativas de *S. pneumoniae* en un ensayo OPA (Tabla 7). Después de dos inmunizaciones con la vacuna 13vPnPS o 13vPnPS + CRM₁₉₇, ninguna pudo inducir titulaciones OPA ≥ 8 veces a la semana 4 con respecto a la semana 0 para 10 de los 13 serotipos medidos (Tabla 7).

15 Para concluir, estos resultados indican que la conjugación de los polisacáridos de la vacuna neumocócica 13-valente producen titulaciones de IgG en suero más altas y en general una mayor actividad de anticuerpos funcionales que la observada solo sin polisacárido o mezclada con CRM₁₉₇ no conjugada.

Tabla 6: Respuestas IgG en conejos (TMG) para PnPS por ELISA después de inmunización con dos dosis del glucoconjugado neumocócico 13-valente

Serotipo	13vPnPS (sin PS)			13vPnPS=CRM ₁₉₇ (PS mezclado con CRM ₁₉₇)			13vPnC		
	Semana 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción Sem.4:Sem 0	Semana 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción Sem.4:Sem 0	Semana 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción Sem.4:Sem 0
1	378	2,290 (843-5,790)	5,8	395	1,959 (809-4,739)	5,0	472	35,970 (29,130-44,417)	76,2
3	57	240 (64-908)	4,2	89	163 (74-358)	1,8	50	10,414 (10,414-16,676)	208,3
4	50	379 (150-959)	7,6	50	607 (313-1,178)	12,1	50	12,890 (9,117-18,224)	257,8
5	343	226 (113-450)	4,5	50	321 (147-701)	6,4	50	35,264 (24,467-50,824)	705,3
6A	154	466 (316-688)	3,0	98	210 (95-464)	2,1	163	234,245 (167,152-328,283)	1,437,1
6B	63	727 (384-1,375)	11,6	62	745 (384-1,440)	12,0	131	33,599 (22,934-49,222)	256,5
7F	50	61 (39-95)	1,2	50	72 (47-111)	1,4	50	35,702 (24,350-52,347)	714,0
9V	50	104 (48-195)	2,1	55	169 (74-390)	3,0	50	50,033 (34,765-72,007)	1,000,7
14	66	298 (117-757)	4,5	50	195 (71-535)	3,9	50	20,121 (12,087-32,138)	402,4
18 C	89	1,555 (655-3,688)	17,5	66	761 (300-1,935)	11,5	101	71,451 (32,745-124,641)	707,4

(continuación)

Serotipo	13vPnPS (sin PS)			13vPnPS=CRM ₁₉₇ (PS mezclado con CRM ₁₉₇)			13vPnC		
	Semana 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción Sem.4:Sem 0	Semana 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción Sem.4:Sem 0	Semana 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción Sem.4:Sem 0
19A	50	89 (44-179)	1,8	50	80 (39-163)	1,6	50	23,485 (12,857-42,723)	469,7
19F	61	1,362 (559-3,317)	22,3	61	991 (370-2,654)	16,3	67	19,358 (12,553-33,173)	288,9
23F	73	1,085 (487-2,420)	14,9	121	638 (311-1,311)	5,3	68	45,972 (25,134-84,089)	676,1

Tabla 7: Titulaciones OPA de *S. pneumoniae* para grupos de suero de conejo después de inmunización con dos dosis de vacunas neumocócicas 13-valentes

Serotipo	Titulaciones OPA						
	Sin Tratamiento	13vPnPS (sin PS)		13vPnPS+CRM ₁₉₇ (sin PS mezclado con CRM ₁₉₇)		13vPnC	
	Semana 0 ^a	Semana 4	Proporción Sem. 4: Sem. 0	Semana 4	Proporción Sem. 4: Sem. 0	Semana 4	Proporción Sem. 4: Sem. 0
1	4	16	4	16	4	8	32
3	4	4	1	4	1	4	8
4	4	4	1	4	1	4	64
5	4	32	8	16	4	16	64
6A	8	64	8	32	4	32	664
6B	8	64	8	32	4	32	32
7F	16	32	2	16	1	16	16
9V	16	16	1	32	2	32	8
14	16	16	1	16	1	16	2
18C	4	16	4	16	4	8	64
19A	8	8	1	8	1	16	64
19F	4	4	1	4	1	8	64
23F	16	32	2	16	1	32	32

a: Usado como valores a la semana 0 para todos los grupos

5

Ejemplo 17

Procedimiento alternativo para la conjugación del sacárido neumocócico de serotipo 3 - CRM₁₉₇

Se descongelaron envases de polisacárido purificado y se combinaron en un recipiente de reacción y se calentaron a una temperatura de 85°C. Cuando durante un incremento de temperatura, la temperatura de la mezcla alcanzó aproximadamente 35 °C, se añadió ácido acético 2 M para conseguir una concentración de ácido acético 0,1 M.

10

Cuando la temperatura de la mezcla alcanzó 85°C, se mantuvo a esta temperatura durante 1 hora para conseguir la hidrólisis/despolimerización. El polisacárido hidrolizado/despolimerizado se enfrió a 23 °C y se añadió MgCl₂ 1 M para conseguir una concentración de MgCl₂ 0,1 M. La oxidación se realizó usando 1-1,25 equivalentes en moles de ácido peryódico, añadido como una solución de 50 mg/ml en API. La mezcla se incubó a 23 °C durante 16-24 horas.

5 La mezcla de reacción se purificó por diafiltración frente a 10x volúmenes de API usando una membrana de poliétersulfona (PES) MWCO de 100K. El polisacárido purificado, activado se ajustó a un pH de 6,0 usando un tampón fosfato 0,2 M (pH 7,0), se combinó con CRM₁₉₇ a una proporción de polisacárido/proteína de 2:1, se congeló en carcasa a -75°C y se co-liofilizó durante 71 horas. Después de la co-liofilización, la mezcla de polisacárido/CRM₁₉₇ se conservó a -25 ° ± de 5 °C hasta la conjugación. Para la conjugación, la mezcla de polisacárido/CRM₁₉₇ co-liofilizada se disolvió en tampón fosfato 0,1 M a una concentración de polisacárido de 20 mg/ml y el pH se ajustó a 6,2 con una combinación de tampón fosfato 0,2 M, pH 4,6 y NaOH 1 M, seguido de la adición de 0,5 equivalentes en moles de cianoborohidruro de sodio como una solución de 100 mg/ml en tampón fosfato 0,15 M, pH 7,5. La mezcla de reacción se agitó y se incubó a 37 °C durante 44 horas. Después de la incubación con cianoborohidruro, la mezcla de reacción se diluyó 1x con solución salina enfriada (2-8 °C) al 0,9% seguido de la adición de 1 equivalente en moles de borohidruro de sodio como una solución de 100 mg/ml en API, para proteger los aldehídos que no han reaccionado, a 23 °C durante 3-6 horas.

20 La mezcla de reacción se transfirió a través de un prefiltro de 0,45-5 µm dentro un recipiente de retenido y después se purificó por diafiltración usando una membrana de celulosa regenerada MWCO de 100K. La mezcla de reacción se diafiltró después 30x contra tampón fosfato 0,1 , pH 9,0 y 20x contra tampón fosfato 0,15 M, pH 6,0. Se realizó una diafiltración final 20x contra succinato 5 mM/solución salina al 0,9%, pH 6,0. El conjugado diafiltrado se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se realizó un ensayo para determinar el contenido de sacáridos. Basándose en el análisis de sacáridos, la solución con el conjugado se diluyó con succinato 5 mM/solución salina al 0,9%, pH 6,0, a una diana de 0,5 mg/ml y de nuevo se filtró estéril (0,2 µm) para conseguir el conjugado concentrado de lote final. El conjugado se conservó a 2-8 °C.

25 Para la caracterización del conjugado, véase el Ejemplo 4.

Debe entenderse que el análisis y los ejemplos anteriores presentan simplemente una descripción detallada de algunas realizaciones.

Referencias

- 30 1. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:100-21.
- 35 2. Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:122-40.
- 40 3. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, y col. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of proteinpolysaccharide conjugate vaccine. *New Engl J Med* 2003; 348(18):1737-46.
- 45 4. Black S, Shinefield H, Hansen J, y col. Postlicensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20:1105-7.
- 50 5. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, y col. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA* 2001; 285:1729-35.
- 55 6. Butler J, Breiman R, Lipman H, y col. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994. *J Infect Dis* 1995; 171:885-9.
- 60 7. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, y col. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; 343:1917-24.
8. Hofmann J, Cetron MS, Farley MM, et al. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N Engl J Med* 1995; 333:481-6.
9. Joloba ML, Windau A, Bajaksouzian S, Appelbaum PC Hausdorff WP, Jacobs MR. Pneumococcal conjugate vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates and the antimicrobial susceptibility of such isolates in children with otitis media. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1489-94.

10. Black S, Shinefield H, Fireman B, y col. Efficacy, safety, and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:187-95.
- 5 11. Rudolph KM, Parkinson AJ, Reasonover AL, Bulkow LR, Parks DJ, Butler JC. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska, 1991-1998. *J Infect Dis* 2000; 182:490-6.
- 10 12. Sniadack DH, Schwartz B, Lipman H, y col. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children: implications for vaccine strategies. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:503-10.
- 15 13. Fagan RL, Hanna JN, Messer RD, Brookes DL, Murphy DM. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in children in Far North Queensland. *J. Paediatr Child Health* 2001; 37:571-5.
- 20 14. Kertesz DA, Di Fabio JL, de Cunto Brandileone MC, y col. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization Surveillance Study. *Clin Infect Dis* 1998; 26:1355-61.
- 25 15. Hausdorff W, Siber G, Paradiso P. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 2001; 357:950-52.
- 30 16. Buckingham SC, King MD, Miller ML. Incidence and etiologies of complicated parapneumonic effusions in children, 1996 to 2001. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:499-504.
- 35 17. Byington C, Spencer L, Johnson T, y col. An epidemiological investigation of a sustained high rate of pediatric parapneumonic empyema: risk factors and microbiological associations. *Clin Infect Dis* 2002; 34:434-40.
- 40 18. Tan T, Mason E, Wald E, y col. Clinical characteristics with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatrics* 2002; 110:1-6.
- 45 19. Block SL, Hedrick J, Harrison CJ, y col. Pneumococcal serotypes from acute otitis media in rural Kentucky. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:859-65.
- 50 20. Hausdorff WP, Yothers G, Dagan R, y col. Multinational study of pneumococcal serotypes causing acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:1008-16.
- 55 21. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, y col. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis* 1983; 148:1136-59.
- 60 22. Nahm MH, Olander JV, Magyarlaki M. Identification of cross-reactive antibodies with low opsonophagocytic activity for *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1997; 176:698-703.
- 65 23. Yu X, Gray B, Chang S, Ward JI, Edwards KM, Nahm MH. Immunity to cross-reactive serotypes induced by pneumococcal conjugate vaccines in infants. *J Infect Dis* 1999; 180:1569-76.
24. Vakevainen M, Eklund C, Eskola J, Kayhty H. Cross-reactivity of antibodies to type 6B and 6A polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*, evoked by pneumococcal conjugate vaccines, in infants. *J Infect Dis* 2001; 184:789-93.
25. Ekstrom N, Kilpi T, Lahdenkari M, Lehtonen H, Ahman H, Kayhty, H. Immune response to cross-reacting pneumococcal serotypes 6A/6B and 19A/19F in the FinOM vaccine trial, Third World of Congress of Pediatric Infectious Diseases, Santiago, Chile, Noviembre 19-23, 2003.
26. Penn RL, Lewin EB, Douglas RG, Jr., Schiffman G, Lee CJ, Robbins JB. Antibody responses in adult volunteers to pneumococcal polysaccharide types 19F and 19A administered singly and in combination. *Infect Immun* 1982 36:1261-2.
27. Giebink GS, Meier JD, Quartey MK, Liebler CL, Le CT. Immunogenicity and efficacy of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-protein conjugate vaccines against homologous and heterologous serotypes in the chinchilla otitis media model. *J Infect Dis* 1996; 173:119-27.
28. Saeland E, Jakobsen H, Ingolfsdottir G, Sigurdardottir ST, Jonsdottir I. Serum samples from infants vaccinated with a pneumococcal conjugate vaccine, PncT, protect mice against invasive infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J Infect Dis* 2001; 183:253-60.

29. Jakobsen H, Sigurdsson VD, Sigurdardottir S, Schulz D, Jonsdottir I. Pneumococcal serotype 19F conjugate vaccine induces cross-protective immunity in serotype 19A in a murine pneumococcal pneumonia model. *Infect Immun* 2003; 71:2956-9.
- 5 30. Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 2003; 349:1341-8.
31. O'Brien KL, Moulton LH, Reid R, y col. Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in American Indian children: group randomised trial. *Lancet* 2003; 362:355-61.
- 10 32. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, y col. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001; 344:403-9.
33. Pilishvili T, Farley M, Vazquez M, Reingold A, Nyquist A, y col. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Abst G-1079, ICAAC, Chicago, IL, 2003.*
- 15 34. Patente de Estados Unidos N° 4.673.574.
35. Patente de Estados Unidos N° 4.902.506.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para fabricar un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido de serotipo 3 de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína transportadora, comprendiendo el procedimiento:
 - 5 (a) hacer reaccionar un polisacárido de serotipo 3 purificado con un ácido débil dando como resultado un polisacárido de serotipo 3 hidrolizado;
 - (b) hacer reaccionar el polisacárido de serotipo 3 hidrolizado con un agente oxidante en presencia de cationes bivalentes dando como resultado un polisacárido de serotipo 3 activado en el que el agente oxidante es ácido peryódico y los cationes bivalentes son Mg^{2+} o Ca^{2+} ;
 - 10 (c) combinar el polisacárido de serotipo 3 activado con una proteína transportadora;
 - (d) hacer reaccionar el polisacárido de serotipo 3 activado y la proteína transportadora combinados con un agente reductor, dando como resultado un conjugado de polisacárido de serotipo 3: proteína transportadora; y
 - 15 (e) proteger los aldehídos que no han reaccionado en el conjugado de polisacárido de serotipo 3: proteína transportadora dando como resultado un conjugado inmunogénico que comprende el polisacárido de serotipo 3 de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína transportadora.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente purificar el polisacárido de serotipo 3 activado antes de combinar con la proteína transportadora.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente co-liofilizar el polisacárido de serotipo 3 activado y la proteína transportadora combinados antes de la reacción con el agente reductor.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente purificar el conjugado inmunogénico.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido débil es ácido acético.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína transportadora es CRM₁₉₇.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la protección de los aldehídos que no han reaccionado comprende hacer reaccionar el conjugado de polisacárido de serotipo 3: proteína transportadora con borohidruro de sodio.
9. Un procedimiento para fabricar un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido de serotipo 3 de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína transportadora, comprendiendo el procedimiento que comprende:
 - 30 (a) hacer reaccionar un polisacárido de serotipo 3 purificado con ácido acético dando como resultado un polisacárido de serotipo 3 hidrolizado;
 - (b) hacer reaccionar el polisacárido de serotipo 3 hidrolizado con ácido peryódico en presencia de $MgCl_2$ dando como resultado un polisacárido de serotipo 3 activado;
 - 35 (c) purificar el polisacárido de serotipo 3 activado;
 - (d) combinar el polisacárido de serotipo 3 activado con una proteína transportadora;
 - (e) co-liofilizar el polisacárido de serotipo 3 activado y la proteína transportadora combinados;
 - (f) hacer reaccionar el polisacárido de serotipo 3 activado y la proteína transportadora co-liofilizados con cianoborohidruro de sodio dando como resultado un conjugado de polisacárido de serotipo 3: proteína transportadora; y
 - 40 (g) proteger los aldehídos que no han reaccionado en el conjugado de polisacárido de serotipo 3: proteína transportadora con borohidruro de sodio dando como resultado un conjugado inmunogénico que comprende el polisacárido de serotipo 3 de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína transportadora.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente purificar el conjugado inmunogénico.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la proteína transportadora es CRM₁₉₇.
12. Un procedimiento para fabricar un polisacárido de serotipo 3 de *Streptococcus pneumoniae* activado, comprendiendo el procedimiento:
 - 50 (a) hacer reaccionar el polisacárido de serotipo 3 purificado con un ácido débil dando como resultado un polisacárido de serotipo 3 hidrolizado; y
 - (b) hacer reaccionar el polisacárido de serotipo 3 hidrolizado con un agente oxidante en presencia de cationes bivalentes dando como resultado un polisacárido de serotipo 3 activado en el que el agente oxidante es ácido peryódico y los cationes bivalentes son Mg^{2+} .

13. El procedimiento de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente purificar el polisacárido de serotipo 3 activado después de la oxidación.

14. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el ácido débil es ácido acético.

Cambios en cuanto a índices de ENI por serotipos en niños < 2 años en los Estados Unidos desde el punto de partida (1998/1999) al año 2001 (observaciones ABC)

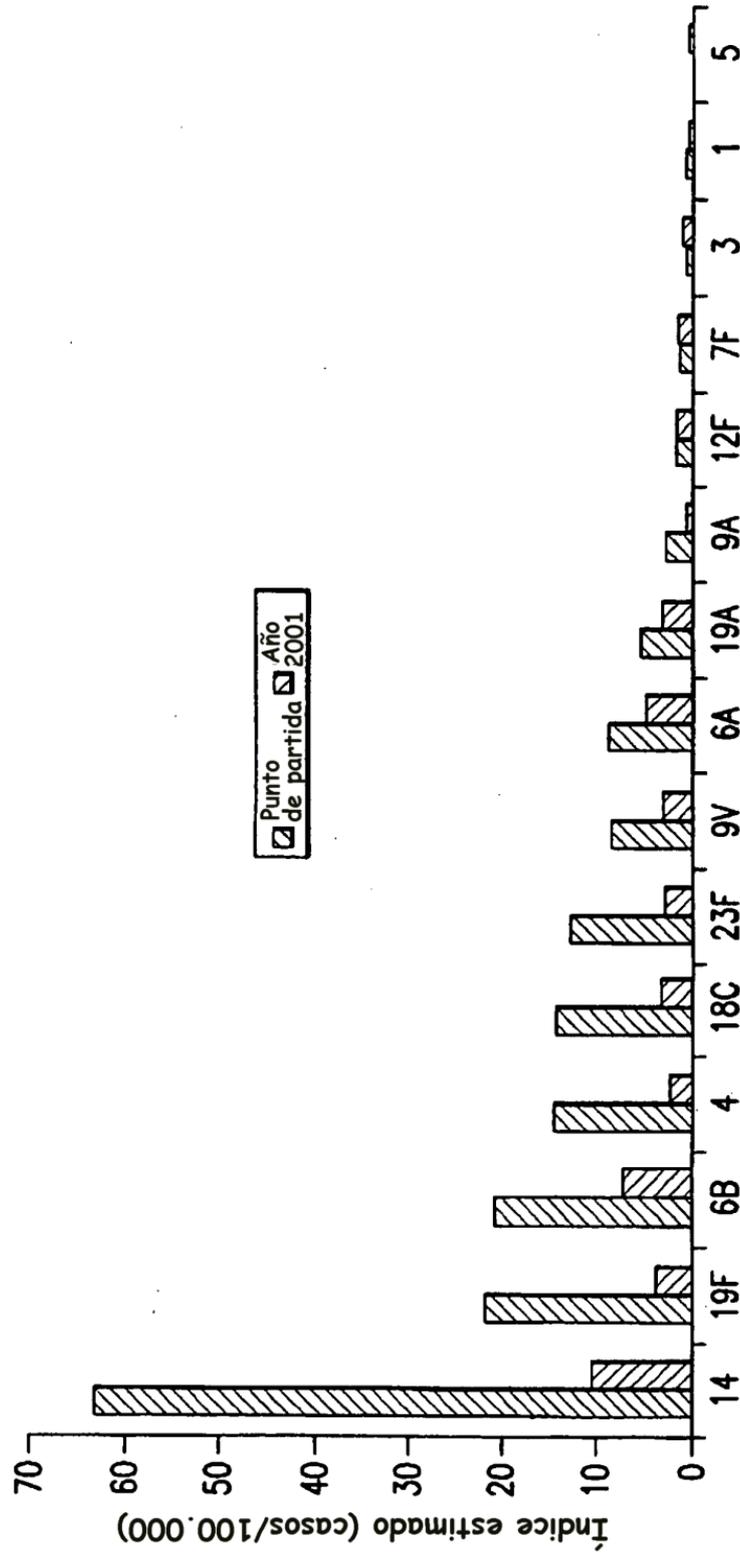


FIG.1

Distribución de aislados neumocócidos con resistencia a PCN en niños < de 5 años (1998)

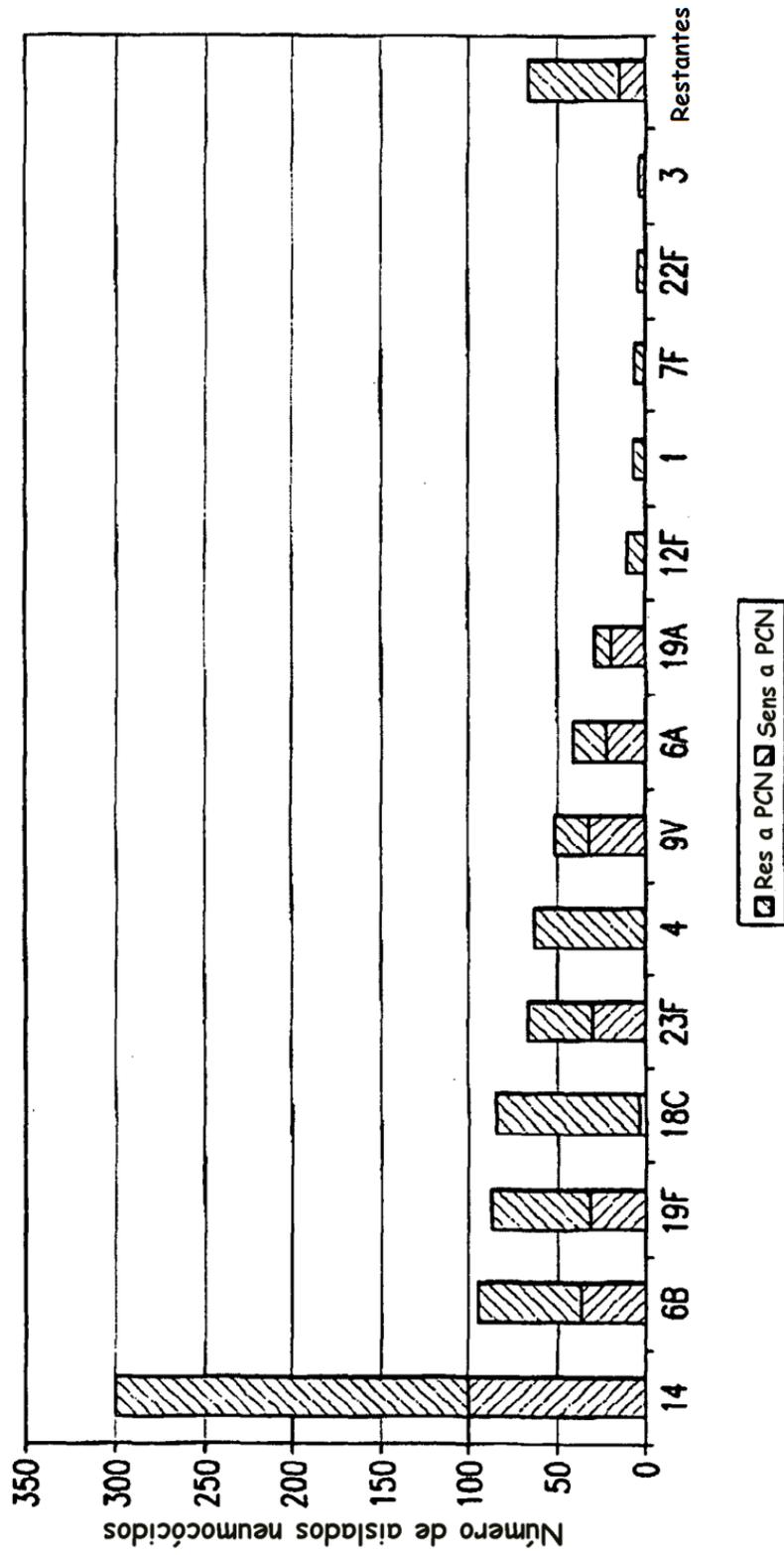


FIG.2

CDAI de resultados OPA después de tres dosis del experimento con Prev(e)nar D118-P16
- Cohorte receptora de un lote fabricado a escala de Prev(e)nar® (n = 98)

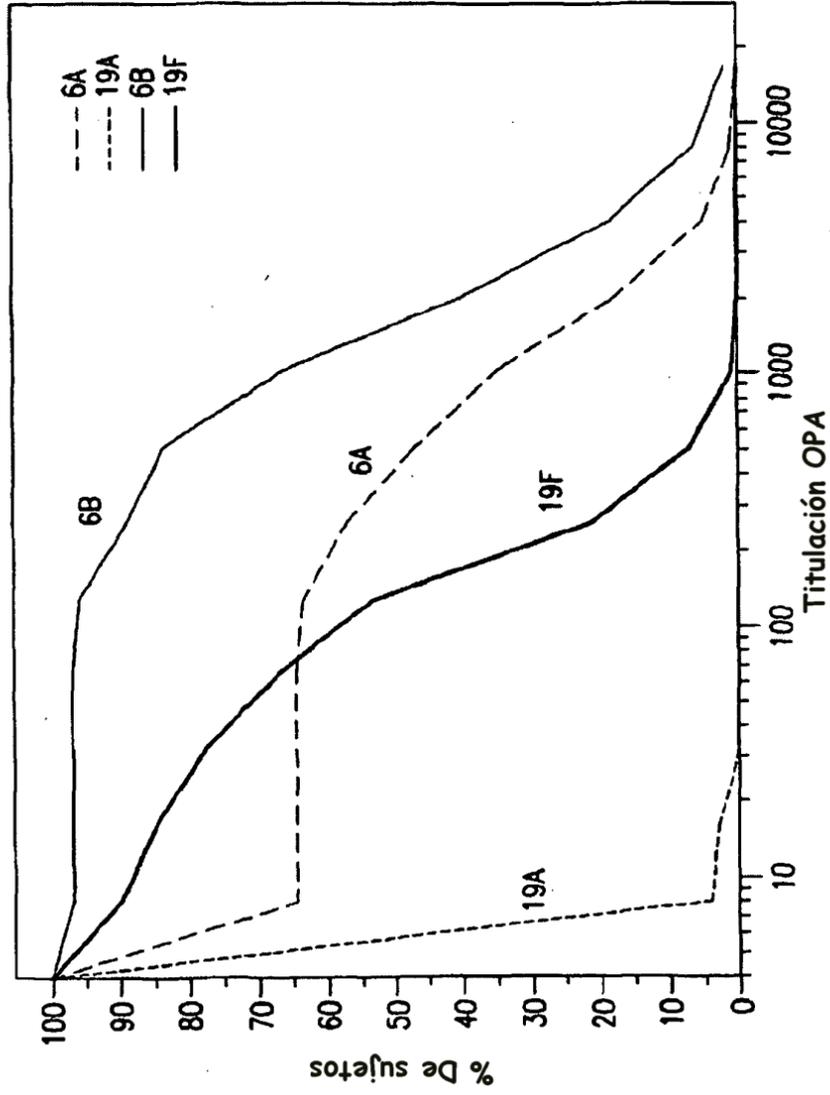


FIG.3